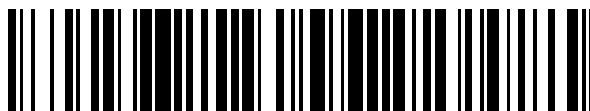


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 845**

51 Int. Cl.:
C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07734628 .6**
96 Fecha de presentación: **22.05.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2109623**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.10.2009**

54 Título: **TRATAMIENTO DE CÁNCER CON ANTICUERPOS ANTI-IL-1.**

30 Prioridad:
22.05.2006 US 802166 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.02.2012

73 Titular/es:
XBiotech, Inc
1055 West Hastings Street, Suite 300
Vancouver, BC V6E 2E9, CA

72 Inventor/es:
SIMARD, John

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 374 845 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de cáncer con anticuerpos anti-IL-1

Antecedentes de la invención

5 El cáncer generalmente mata invadiendo estructuras de tejido adyacente, afectando a la fisiología de órganos críticos. Se ha descubierto que el proceso de metástasis es simultáneo a la desdiferenciación de lesiones tumorales primarias. Un corolario de desdiferenciación tumoral es la heterogeneidad tumoral. La tríada de desdiferenciación, heterogeneidad y metástasis conduce a una mezcla mortal. Una vez que el cáncer se ha hecho metastásico y heterogéneo, la posibilidad de tratamiento antitumoral completo es remota. La esperanza que existe desde hace mucho tiempo es identificar algunos elementos comunes de tumores metastásicos, una característica crucial que se mantenga durante la proliferación y la desdiferenciación incluso en los tumores más heterogéneos, una características que sea tan intrínseca al proceso de metástasis que esté presente virtualmente en todas las célula tumorales con independencia del origen o tropismo. Con la identificación de tales elementos cruciales, la noción de tratar una enfermedad avanzada y diseminada puede tener una base en la realidad.

Breve descripción de la figura

15 Figura 1. Los gráficos que muestran respuestas tumorales en ratones desnudos con xenotransplantes de tumores humanos después del tratamiento con anticuerpos anti-IL-1 α . Los ratones se tratan con anticuerpo monoclonal de ratón anti-humano anti-IL-1 α (m_h IL-1 α) o anticuerpo monoclonal de hámster anti-humano IL-1 α (h_a mIL-1 α) o ambos (m_a h_a IL-1 α + h_a mIL-1 α). A los ratones se les administran dosis de 5 mg/kg de cada anticuerpo dos veces a la semana comenzando el día del xenotransplante (Tumor Día 1) o después del establecimiento de la enfermedad metastásica (Tumor Establecido). Los ratones se sacrifican cuando llevan una considerable carga tumoral y se encuentran en obvio malestar. La Figura 1A, tumor de próstata, día 1; Figura 1B; tumor de mama, día 1; Figura 1C, tumor de próstata establecido; Figura 1D, tumor de mama establecido.

25 Figura 2. La formación de autoanticuerpo anti-IL-1 α el día 56 en ratones C57BL/6 después de tres inyecciones subcutáneas con conjugado IL-1 α -PPD en alumbre (\blacklozenge). Los ratones control se inmunizaron con PPD solamente en alumbre (\blacksquare).

30 Figura 3. El complemento dependiente de anticuerpo medió la eliminación de células EL-4. Las células EL-4 se incubaron con diluciones en serie de antisuero policlonal de ratón IL-1 α anti-ratón. La proporción de células eliminadas con células viables es proporcional a la concentración de suero. Un anticuerpo monoclonal humano IL-1 α anti-ratón se usó como un control positivo. La incubación con suero murino que no había sido tratado o con solamente medio de cultivo sirvieron como los dos controles negativos.

Descripción detallada de la invención

35 Identificar IL-1 α con un anticuerpo puede usarse como un tratamiento para el cáncer. En particular, el anticuerpo IL-1 α puede inhibir el potencial metastásico de tumores a través de la interrupción del papel fisiológico que IL-1 α derivado del tumor juega en la metástasis tumoral. Además, debido a que los tumores expresan IL-1 α , un anticuerpo que se identifique IL-1 α puede causar citotoxicidad tumoral directa a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (comúnmente referida como ADCC).

40 Es muy inesperado que la interleuquina-1 alpha (IL-1 α) pueda ser una diana para la terapia de cáncer. Para entender esto es necesaria una breve revisión de la historia del llamado sistema interleuquina-1. El sistema IL-1 incluye IL-1 α , interleuquina-1 beta (IL-1 β), antagonista receptor de interleuquina-1 (IL-1ra) y receptor 1 de interleuquina (IL-1R1). Después de casi tres décadas desde el descubrimiento de IL-1 α e IL-1 β , se ha progresado poco en la distinción de papeles biológicos separados para los dos productos genéticos. Esta inhabilidad para aclarar las funciones biológicas independientes de estas dos citoquinas está demostrada por la referencia común en la bibliografía científica simplemente a interleuquina-1, que ha sido durante décadas la nomenclatura que colectivamente se refiere a IL-1 α y/o IL-1 β . Este fallo en la distinción de estas dos citoquinas es tan único como peculiar, considerando las diferencias bastante claras entre IL-1 α e IL-1 β : no comparten una significativa homología de secuencia proteica; están bajo diferente regulación transcripcional, dando como resultado una separación temporal y espacial de expresión; están independientemente reguladas a través de maquinaria de procesos post-traslacionales separados e individualmente complejos; están sometidas a modificaciones post-traslacionales únicas y separadas; y tienen diferente distribución de tejido y se incrementan en respuesta a diferentes estímulos. Además, IL-1 α es una membrana anclada a través de una cola de lípido y tiene actividad de enlace del tipo lectina, mientras que IL-1 β es una proteína segregada.

55 Considerando las diferencias entre estas citoquinas, merece la pena entender por qué IL-1 α e IL-1 β deberían haberse referido colectivamente como interleuquina-1. En primer lugar, la temprana suposición de que los dos productos genéticos representaban solamente una única actividad biológica, o quizás para matizar más esto, que IL-1 α tenía poca función biológica notable. Esto no tuvo en cuenta que IL-1 α resultara del hecho de que no había ningún mecanismo secretor conocido para la citoquina, ninguna secuencia de transmembrana que pudiera permitir la integración en la membrana, y ninguna secuencia de señal codificada para la traslocación de vesículas

secretoras. Se pensaba que IL-1 α estaba contenida en el citoplasma, y un papel como una molécula de señalización intracelular sugirió que tenía poca relevancia como verdadera citoquina. Por otro lado, un proceso post-traslacional y un recorrido secretor se establecieron rápidamente para IL-1 β . De hecho, la única relevancia de IL-1 α en el llamado sistema interleuquina-1, parecía ser que demostró inducir señalización a través del receptor-1 IL-1, que se descubrió que inducía señalización en respuesta a IL-1 α e IL-1 β . Debido a que no había mecanismo para la secreción, se postuló que IL-1 α podía solamente realizar un papel fisiológico cuando se liberara desde el citoplasma de células muertas. Pero el fallo en encontrar niveles significativos de IL-1 α en suero o tejidos bajo casi cualquier circunstancia pareció minimizar la posible importancia de IL-1 α .

De este modo es bastante inesperado que el tratamiento de animales con un anticuerpo anti-IL-1 α pueda proteger a los animales de formas agresivas de cáncer. Similarmente, la inmunización de animales para inducir un título de anticuerpo anti-IL-1 α puede proteger a los animales de tumores. El mecanismo de acción aún no está claro y puede implicar una o más combinaciones de una neutralización de producción de IL-1 α pro-tumor del huésped, la neutralización de producción de IL-1 α tumoral o dirigir la citotoxicidad del tumor a través de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o eliminación mediada complementaria dependiente de anticuerpos (ADCK).

Los pacientes que pueden tratarse de acuerdo con la invención incluyen tanto humanos como mamíferos no humanos, tales como animales de compañía, animales de laboratorio, modelos de animales, etc. (por ejemplo, gatos, perros, ovejas, cerdos, cabras).

Los "anticuerpos" como se usan en el presente documento incluyen moléculas intactas de inmunoglobulina policlonales o monoclonales; fragmentos de inmunoglobulina, tales como Fab, F(ab')₂, scFv y Fv monoméricos o dimericos; y moléculas que ocurren de manera no natural tales como diacuerpos, minicuerpos, cuerpos Kappa, Janusins, y similares. Los anticuerpos útiles en procedimientos terapéuticos de la invención comprenden un sitio de enlace de IL-1 α y un enlace específicamente con IL-1 α . Los "sitios de enlace de IL-1 α " como se usan en el presente documento incluyen sitios de enlace de IL-1 α que ocurren de manera natural en la parte variable de anticuerpos. Los sitios de enlace IL-1 α también incluyen sitios de enlace que difieren de los sitios de enlace de IL-1 α que ocurren de manera natural en entre 1 y 15 sustituciones de aminoácido conservador (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 13, 11, 12, 13, 14 o 15) y que específicamente se enlazan con IL-1 α . Típicamente, un anticuerpo que se enlaza específicamente con IL-1 α proporciona una señal de detección al menos 10, 20 o 100 veces más alta que una señal de detección proporcionada con un antígeno no IL-1 α cuando se usa en un ensayo inmunoquímico. Preferentemente, los anticuerpos que se enlazan específicamente con IL-1 α no detectan otras proteínas en ensayos inmunoquímicos y pueden inmunoprecipitar IL-1 α de una solución.

Los anticuerpos policlonales pueden obtenerse inmunizando un huésped apropiado con IL-1 α usando procedimientos bien conocidos. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales son preferentes. Los anticuerpos monoclonales (por ejemplo, de longitud completa, scFv, Fv) pueden prepararse usando cualquier técnica que mantenga la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estas técnicas incluyen, pero no se limitan a, la técnica del hibridoma, la técnica del hibridoma de célula B humana, y la técnica del hibridoma EBV. Véase Roberge y col., *Science* 269, 202-204, 1995; Kohler y col., *Nature* 256, 495-497, 1985; Kozbor y col., *J. Immunol. Methods* 81, 31-42; 1985; Cote y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 2026-2030; 1983; y Shimmamoto y col., *Biologicals*, 2005 Sep; 33(3):169-74. Los anticuerpos de cadena sencilla pueden generarse revolviendo la cadena de bibliotecas combinatorias arbitrarias. Taketa y col., *Nature* 314, 452-454, 1985.

Los anticuerpos de cadena sencilla también pueden construirse usando un procedimiento de amplificación de ADN tal como PCR, usando cADN de hibridoma como una plantilla. Los anticuerpos de cadena sencilla pueden ser mono- o biespecíficos o pueden ser bivalentes o trivalentes. La construcción de anticuerpos de cadena sencilla tetraivalentes y biespecíficos es bien conocida en la técnica. Una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de cadena sencilla puede construirse usando una síntesis de nucleótido manual o automatizada, clonarse en una construcción de expresión usando procedimientos convencionales recombinantes de ADN, e introducirse en una célula para expresar la secuencia codificadora. Alternativamente, los anticuerpos de cadena sencilla pueden producirse directamente usando, por ejemplo, la tecnología de fago filamentoso. Burton y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 11120-23, 1991; Verhaar y col., *Int. J. Cancer* 61, 497-501, 1995.

Los anticuerpos IL-1 α útiles en la invención pueden purificarse a partir de cualquier célula que exprese los anticuerpos, incluyendo células huéspedes que se han transfectado con moléculas de ácido nucleico codificadoras de anticuerpos. Las células huéspedes se cultivan bajo condiciones adecuadas para la expresión de los anticuerpos. Las células huéspedes y las condiciones de cultivo apropiadas pueden seleccionarse de la amplia variedad conocida en la técnica.

Los anticuerpos se separan de otros compuestos que normalmente se asocian con el anticuerpo en la célula, tales como ciertas proteínas, carbohidratos o lípidos. Los procedimientos de purificación incluyen, pero no se limitan a, la cromatografía de exclusión por tamaño, fraccionamiento con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y electroforesis en gel preparativo. Una preparación de anticuerpos purificados es al menos 80% pura; preferentemente, las preparaciones son 90%, 95% o 99% puras. La pureza de las preparaciones puede calcularse mediante cualquier medio conocido en la técnica, tal como electroforesis en gel de poliacrilamida SDS. Una preparación de anticuerpos purificados de la invención puede contener más de un tipo de anticuerpo que

específicamente se enlaza con IL-1 α .

Los anticuerpos policlonales o monoclonales de longitud completa, comoquiera que se preparen, pueden partirse con técnicas convencionales para obtener fragmentos funcionales de anticuerpo tales como Fab o F(ab')₂. Véase Cheung y col., *Protein Expr. Purif.* 32, 135-40, 2003. Pueden prepararse proteínas de enlace que se derivan de inmunoglobulinas y que son multivalentes y multiespecíficas, tales como los "diacuerpos" descritos en el documento WO 94/13804 y Holliger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6444-48, 1993; los "minicuerpos" descritos en Martin y col. *EMBO J.* 13, 5303-09, 1994; "cuerpos Kappa" descritos en Ill y col., *Protein Eng.* 10, 949-57, 1997; y "Janusins" (moléculas biespecíficas de cadena sencilla) descritos en Traunecker y col., *EMBO J.* 10, 3655-3659, 1991, y Traunecker y col., *Int. J. Cancer Suppl.* 7, 51-52, 1992.

5
10
15
20
Cualquier anticuerpo IL-1 α útil en la invención también puede producirse usando procedimientos químicos para sintetizar su secuencia de aminoácido, tal como mediante síntesis directa de péptido usando técnicas en fase sólida (Merrifields, *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-54, 1963; Roberge y col., *Science* 269, 202-04, 1995). La síntesis de proteínas puede realizarse usando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada puede conseguirse, por ejemplo, usando el Sintetizador de Péptidos de Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer). Opcionalmente, los fragmentos de anticuerpos pueden sintetizarse por separado y combinarse usando procedimientos químicos para producir una molécula de longitud completa. Las moléculas recién sintetizadas pueden purificarse sustancialmente mediante cromatografía líquida preparativa de alto rendimiento (por ejemplo, Creighton; *PROTEINS: STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES*, WH Freeman and Co., Nueva York, N.Y., 1983). La composición de un polipéptido sintético puede confirmarse mediante análisis o secuenciación de aminoácido (por ejemplo, usando la degradación Edman).

25
30
35
Los expertos en la técnica pueden usar soluciones estériles inyectables fisiológicamente aceptables para preparar composiciones farmacéuticas apropiadas que comprenden anticuerpos de la invención. Las soluciones isotónicas acuosas, tales como soluciones salinas o las correspondientes soluciones de proteína de plasma, están fácilmente disponibles y pueden usarse para preparar soluciones listas para su uso para inyección parenteral o infusión. Las composiciones farmacéuticas pueden almacenarse como liofilizados o preparaciones secas, que pueden reconstituirse con una solución inyectable conocida antes de sus uso. Una composición farmacéutica puede estar complementada con sustancias portadoras conocidas y/o aditivos (por ejemplo, albúmina de suero, dextrosa, bisulfito sódico, EDTA, etc.). Las composiciones farmacéuticas de la invención típicamente comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un diluyente inerte.

30
35
Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse mediante diferentes vías conocidas por aquellos expertos en la técnica. Para aplicación sistémica, puede usarse la vía intravenosa, intravascular, intramuscular, intraarterial, intraperitoneal, oral, intranodal o intratecal. La aplicación más localizada puede efectuarse subcutáneamente, intercutáneamente, intracardialmente, intralobularmente, intramedularmente, intrapulmonarmente o directamente en o cerca del tejido a ser tratado. Dependiendo de la duración y eficacia deseada del tratamiento, las composiciones pueden administrarse una vez o varias veces, por ejemplo sobre una base diaria durante varios días, semanas o meses, y en diferentes dosis.

40
La dosis dependerá de la edad, condición, sexo y extensión de la enfermedad en el paciente y puede variar de 0,25 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg del peso corporal del paciente. Los cánceres que pueden tratarse incluyen, pero no se limitan a, cánceres de sangre (por ejemplo, leucemias, linfomas) y cánceres de tejidos sólidos (por ejemplo, vejiga, hueso, cerebro, mama, cuello del útero, colon, esófago, riñón, hígado, pulmón, páncreas, próstata, estómago).

45
En una realización, se inmuniza al paciente contra IL-1 α para inducir anticuerpos IL-1 α . Puede usarse cualquier procedimiento de inmunización conocido en la técnica para conseguir la respuesta deseada del anticuerpo (véase más abajo). En general, IL-1 α recombinante pueden usarse en una fórmula que contiene un adyuvante para conseguir la inmunización; una secuencia de ácido nucleico que codifica IL-1 α puede usarse para hacer un virus u organismo recombinante que pueda usarse para inmunizar; o IL-1 α recombinante puede unirse químicamente a partículas del tipo virus, que actúan como complejos inmunoestimulantes.

ADYUVANTE	EJEMPLO
Sal Inorgánica	Hidróxido de aluminio, fosfato de calcio, hidróxido de berilio
Sistemas de administración	Adyuvante Incompleto de Freund
Productos Bacterianos	Adyuvante Completo de Freund, BCG, plásmido
ADN	Unidades CpG
Complejos Inmunoestimulantes (ISCOMS)	Mezcla de Quil A que contiene proteínas víricas
Citoquinas	GM-CSF, IL-12, IL-1, IL-2
Virus Recombinante	Gripe
Conjugado de partícula del tipo virus	2/6 VLP que contiene rotavirus bovino VP2 y rotavirus humano VP6
Bacterias recombinantes	Salmonella typhimurium atenuada

5 La divulgación anterior describe generalmente la presente invención. Puede obtenerse una comprensión más completa mediante referencia a los siguientes ejemplos específicos, que se proporcionan solamente para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Animales y células tumorales

10 Se generan datos usando ratones Atímicos nu/nu (8-10 semanas de edad, NCI, Frederick, MD). Los ratones se inyectaron subcutáneamente en la ijada con 5×10^6 células tumorales suspendidas en 200 μ l de DMEM. Debido a que los presentes inventores esperaban que IL-1 α podría proporcionar un mecanismo general para la viabilidad de la célula tumoral, analizaron varias líneas de células tumorales para la inhibición con anti-IL-1 α , inyectando a los animales células tumorales derivadas de linajes de la mama (MDA-MB-436 o MDA-MB-231, Nozaki y col., Biochem Biophys Res Comm 275, 60-62 (2000) o de la próstata (PC-3, Chung y col. The Prostate 38:199-207 (1999); Singer CF y col., Clin Cancer Res. 2003 Oct 15; 9(13):4877-83), que previamente había demostrado expresar IL-1 α .

15 Los ratones se inyectaron con anticuerpos anti-humano IL-1 α de ratón para antagonizar la producción de IL-1 α tumoral. Los ratones recibieron 5 mg/kg de anticuerpo monoclonal IgG1 (clon 364-3B3-14, BioLegend) o 5 mg/kg de anticuerpo monoclonal IgG2a (Clon 1F3B3, ProMab), administrados intraperitonealmente dos veces a la semana, comenzando el día de la implantación del tumor o después de la evidencia de una lesión de tumor primario de al menos aproximadamente 3 mm³. Otros dos grupos de ratones recibieron el anticuerpo monoclonal IgG1 o el anticuerpo monoclonal IgG2 así como 5 mg/kg de un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α anti-ratón (IL-1 α de Hámster anti-ratón se compra en BD PharMingen (San Diego, Calif)), con el fin de neutralizar la producción endógena de IL-1 α .

25 Los animales se mantienen vivos durante 56 días a menos que se sacrifiquen antes por razones humanitarias, debido a la excesiva carga tumoral. Cada semana se registran los pesos corporales y se mide el volumen de tumor observable. Los animales se sacrifican cuando hay evidente morbilidad relacionada con el tumor (pérdida de peso, letargo). Los ratones se sacrifican usando una cámara de CO₂. Las metástasis se cosechan y almacenan por separado después de un examen profundo de las cavidades abdominales y peritoneales y los órganos de mayor importancia, incluyendo el hígado, los ganglios linfáticos, el bazo y los pulmones. Se calcula la masa de tumor agregado. Los resultados de supervivencia y carga tumoral se expresan como promedios +/- SE.

30 Ejemplo 2

Inmunohistoquímica

35 Los especímenes extirpados de tumor metastásico con tejido circundante se toman de algunos animales para análisis histológico. En el momento del sacrificio se generan preparaciones tumorales fijadas a formalina e introducidas en parafina. El análisis histológico se realiza usando anticuerpos IL-1 α anti-murinos y anti-humanos, así como anti-VEGF, anti-ICAM-1, anti-E-Selectina y se realiza tinción con anti-VCAM.

Ejemplo 3

PCR

5 Se extrae ARN de cada una de las líneas celulares de tumor y de las biopsias tumorales tomadas de los ratones con tumores subcutáneamente trasplantados estabilizados. Las células se analizan usando RT-PCR para las transcripciones de IL-1 α . Los cebadores se designan para identificar específicamente IL-1 α humano, para que no haya confusión en muestras de biopsia tumoral si las transcripciones de IL-1 α están o no derivadas de células tumorales o de producción endógena. Además, se designan los cebadores específicos de ratón IL-1 α para identificar IL-1 α endógeno que puede haberse producido de infiltrar leucocitos o del tejido circundante del microambiente del tumor. Ya que IL-1 α de cualquier fuente puede ser importante en la creación de un microambiente favorable de tumor.

10 El ARN total se aísla de las muestras de tumor con Trizol (Gibco/BRL Life Technologies, Rockville, MD, USA) como el fabricante dirige. El ADN contaminante se saca con ADNasa libre de ARNasa. Un μ g de ARNasa total tratado con ADNasa (o agua como un control negativo) se incuba con 1 μ g de cebador oligo dT a 95 °C durante 3 minutos y después a 68 °C durante 10 minutos. Ocho μ l de 5 x tampón , 4 μ l DTT (0,1M), 2 μ l de dNTP (10mM), 1 μ l de inhibidor de ARNasa, y 1 μ l de transcriptasa inversa de superíndice se añaden a cada reacción de acuerdo con el procedimiento de Lee y col. (Journal of Orthopaedic Research, 21 (2003) 62-72).

Ejemplo 4

Un anticuerpo IL-1 α Reduce la Incidencia Metastásica

20 Los ratones un/un que tienen tumores metastásicos establecidos se tratan dos veces a la semana con inyecciones intraperitoneales de PBS, 5 mg/kg de m_{a_h} IL-1 α b, o 5 mg/kg de h_{a_m} IL-1 α b junto con 5 mg/kg de h_{a_m} IL-1 α . Se usan dos grupos de ratones que tiene tumor, aquellos inyectados con 5×10^6 células tumorales MDA-MB-436 o PC-3. El anticuerpo se administra dos veces a la semana, comenzando bien el día de la inyección subcutánea de las células tumorales o después del crecimiento del tumor de 3 mm³. Véase Tabla 1.

Tabla 1. Descripción del Diseño Experimental y Números de Animales

	PBS	m_{a_h} IL-1 α + h_{a_m} IL-1 α	m_{a_h} IL-1 α	h_{a_m} IL-1 α
D1MDA-MB436	6	6	6	6
D1PC-3	6	6	6	6
EstMDA-MB436	6	6	6	6
EstPC-3	6	6	6	6

25 Las colonias de tumores visibles se cuentan en los órganos en el momento del sacrificio. El número de metástasis superficiales de hígado se determina mediante inspección del tejido para visualizar los focos tumorales. El número de focos metastásicos en el diafragma, intestino y pared peritoneal y ganglios linfáticos se determina de manera similar.

30 En los modelos de tumores de mama las metástasis visibles de ganglio linfático, pulmón e hígado se reducen mediante el tratamiento con m_{a_h} IL-1 α o mediante el tratamiento de combinación con m_{a_h} IL-1 α b + h_{a_m} IL-1 α b. Un cien por cien de los ratones control tratados desarrollaron ascitis a diferencia de la formación de ascitis en solamente el 10% de los ratones tratados con anti-IL-1 α . Se hacen observaciones similares con el modelo de tumor de próstata, en las que los ratones que recibían m_{a_h} IL-1 α o m_{a_h} IL-1 α b + h_{a_m} IL-1 α b han reducido la carga metastásica. En ambos modelos de tumor de mama y próstata, los ratones a los que se les administró h_{a_m} IL-1 α b no mostraron una aparente reducción en metástasis en el momento del sacrificio. Véase Tabla 2.

Tabla 2. Control de tumores xenotransplantados mediante tratamiento con anticuerpo de aIL-1 α

D1MDA-MB436	PBS	$m_{a_h}IL-1\alpha + h_{a_m}IL-1\alpha$	$m_{a_h}IL-1\alpha$	$h_{a_m}IL-1\alpha$
Ascitis	6(100)	0(0)	1(17)	4(66)
Ganglio linfático	6(100)	1(17)	2(33)	6(100)
Peritoneal	6(100)	0(0)	1(17)	6(100)
Hígado	6(100)	1(17)	3(50)	6(100)
EstMDA-MB436	PBS	$m_{a_h}IL-1\alpha + h_{a_m}IL-1\alpha$	$m_{a_h}IL-1\alpha$	$h_{a_m}IL-1\alpha$
Ascitis	6(100)	0(0)	0(0)	4(66)
Ganglio linfático	6(100)	4(66)	5(83)	6(100)
Peritoneal	6(100)	3(50)	5(83)	6(100)
Hígado	6(100)	3(50)	5(83)	6(100)
D1PC-3	PBS	$m_{a_h}IL-1\alpha + h_{a_m}IL-1\alpha$	$m_{a_h}IL-1\alpha$	$h_{a_m}IL-1\alpha$
Ascitis	6(100)	0(0)	0(0)	3(50)
Ganglio linfático	6(100)	0(0)	3(33)	5(83)
Peritoneal	6(100)	1(17)	2(33)	6(100)
Hígado	6(100)	0(0)	1(17)	6(100)
EstPC-3	PBS	$m_{a_h}IL-1\alpha + h_{a_m}IL-1\alpha$	$m_{a_h}IL-1\alpha$	$h_{a_m}IL-1\alpha$
Ascitis	6(100)	0	0	5(83)
Ganglio linfático	6(100)	3(50)	3(50)	6(100)
Peritoneal	6(100)	4(66)	2(33)	6(100)
Hígado	6(100)	3(50)	2(33)	6(100)

5 Todos los ratones tratados con PBS se sacrificaron el Día 50, mientras que no todos los ratones tratados con IL-1 α sucumbieron a los tumores xenotransplantados de mama o próstata después de 60 días. Un tratamiento de IL-1 α que identifica IL-1 α expresado por el tumor o IL-1 α derivado endógeno (principalmente leucocito) reduce la carga metastásica en ratones que tienen cáncer xenotrasplantado de mama o próstata. Un tratamiento de IL-1 α que
 10 identifica IL-1 α expresado por el tumor tiene un efecto antitumoral estadísticamente más potente, mientras que en tratamiento de anticuerpo IL-1 α combinado anti-tumor y anti-endógeno proporciona un bloqueo casi completo del crecimiento tumoral metastásico en ratones nu/nu que tienen tumores de mama o próstata. Véase Figura 1.

15 Los ratones que reciben $m_{a_h}IL-1\alpha$ o $h_{a_m}IL-1\alpha$ o una combinación de los dos anticuerpos han reducido la severidad del curso clínico de la enfermedad. Todos los animales control finalmente parecen moribundos y requieren el sacrificio antes del final del estudio. Sin embargo, los animales que reciben $m_{a_h}IL-1\alpha + h_{a_m}IL-1\alpha$ son normales en apariencia, pulcros, activos, no muestran signos de dolor, muestran crecimiento normal y aumento de peso, y todos sobreviven durante la duración del experimento. Los ratones que reciben la combinación de anticuerpos, sin embargo, revelan lesiones metastásicas observables después de la recuperación cuidadosa post mortem de los órganos. Esto es particularmente evidente en animales que han establecido tumores metastásicos antes de comenzar el tratamiento. Parece que los ratones que reciben tratamiento solamente después de desarrollar lesiones metastásicas establecidas son incapaces de eliminar posteriormente todas las lesiones establecidas. Sin embargo,
 20 las lesiones metastásicas en estos ratones tratados se detienen aparentemente.

Este efecto puede analizarse después de inocular ratones con tumor de mama o próstata y sacrificar los animales en el momento de enfermedad metastásica detectable, que es el mismo curso de enfermedad en el que los animales reciben tratamiento. La abundancia y tamaño de las lesiones metastásicas es notablemente mayor en esos ratones que la que se observa post mortem en animales que reciben la combinación $m_a hIL-1\alpha + h_a mIL-1\alpha$. Parece que el tratamiento con el anticuerpo da como resultado una regresión de la enfermedad metastásica establecida.

Los ratones tratados con $m_a hIL-1\alpha + h_a mIL-1\alpha$ que reciben la inyección de anticuerpo comenzando el Día 1 después de la inoculación del tumor están casi prevenidos de desarrollar metástasis. Solamente un único animal (17%) en cada grupo de tumor de mama y próstata desarrolla una lesión metastásica.

Los tumores humanos xenotrasplantados se usan en un modelo de ratón desnudo de metástasis tumoral. El uso de tumores humanos, que expresan IL-1 α humano, permite a los presente inventores intentar tratar a los ratones identificando: IL-1 α humano expresado en tumores; IL-1 α murino expresado en leucocitos (que por simplificar son referidos como producción de IL-1 α endógeno); o administrando dos anticuerpos diferentes, identificando simultáneamente IL-1 α endógeno y derivado de tumor. Esto les permite comenzar a esclarecer, de alguna manera, el papel en la metástasis de IL-1 α derivado de tumor de IL-1 α endógeno producido (expresado desde el infiltrado leucocítico o desde tejidos del microambiente tumoral).

Los resultados sugieren que tanto IL-1 α endógeno como el derivado del tumor juegan un papel en la metástasis tumoral, porque el anticuerpo dirigido frente a cualquier fuente de IL-1 α mejora la supervivencia en ratones. El anticuerpo dirigido frente IL-1 α endógeno es, sin embargo, considerablemente menos eficaz proporcionando el beneficio de supervivencia a largo plazo y no protege a los ratones de metástasis en comparación con el anticuerpo que identifica IL-1 α derivado del tumor. Evidentemente, la expresión de IL-1 α de los propios tumores es suficiente para estimular metástasis en estos modelos.

El anticuerpo dirigido frente a IL-1 α expresado por el tumor tiene potentes efectos anti-tumorales. Los profundos efectos anti-tumorales en animales que reciben el anticuerpo IL-1 α anti-tumor parecen implicar un bloqueo fisiológico de IL-1 α en metástasis tumorales, pero pueden también implicar una acción tumoricida directa del anticuerpo. Los presentes inventores esperan que la identificación de IL-1 α expresado por el tumor usando un anticuerpo IgG1, una subclase de anticuerpo que eficientemente induce la fijación complementaria y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), puedan representar una acción tumoricida considerable frente a los tumores que expresan IL-1 α en el modelo de ratón desnudo. Sin embargo, si el efecto antitumoral del anticuerpo dirigido frente a IL-1 α derivado del tumor actúa exclusivamente por medio de ADCC u otro mecanismo citotóxico, no se esperaría ningún efecto sinérgico con los dos anticuerpos. Tampoco se esperaría que el anticuerpo dirigido frente a IL-1 α endógeno pudiera tener impacto en la supervivencia; mientras, hay un beneficio consistente, aunque modesto, de supervivencia observado en animales tratados con anticuerpo dirigido frente a IL-1 α endógeno. Es posible que el beneficio de supervivencia observado de la identificación de IL-1 α anti-endógeno con el anticuerpo $h_a mIL-1\alpha$ sea un resultado de la reactividad cruzada de $h_a mIL-1\alpha$ con IL-1 α humano, identificando así directamente el tumor. Los presentes inventores examinaron la reactividad cruzada para el anticuerpo IL-1 α anti-murino, para evaluar si el beneficio de supervivencia es un resultado directo de la reactividad cruzada del anticuerpo con IL-1 α expresado por el tumor, induciendo ADCC del tumor, el bloqueo fisiológico de IL-1 α de la producción de IL-1 α tumoral, o ambos. No hay aparente reactividad cruzada con el anticuerpo. Además, el anticuerpo $h_a mIL-1\alpha$ no se enlaza eficientemente a los receptores murinos Fc y no induciría probablemente una respuesta ADCC eficaz.

A partir de los resultados de la identificación diferencial de IL-1 α endógeno y el expresado por el tumor en un modelo de xenotrasplante en ratones desnudos los presentes inventores concluyen que el bloqueo fisiológico de IL-1 α puede reducir la letalidad de tumores. El efecto sinérgico del beneficio de supervivencia para la combinación de anticuerpo anti-IL-1 α , dirigida tanto a IL-1 α endógeno como al derivado del tumor, proporciona evidencias convincentes de que la fuente tumoral y la endógena de IL-1 α son importantes en la metástasis tumoral en este modelo. Estos resultados también aclaran de manera favorable otros informes que sugieren que IL-1 α juega un papel fisiológico en la interacción dinámica entre el tumor y el huésped; y que la expresión IL-1 α puede aumentar el potencial metastásico de tumores.

La identificación de la producción de IL-1 α mediante células tumorales usando un anticuerpo monoclonal es un medio eficaz de prolongar la supervivencia y reducir la carga metastásica. Identificar anticuerpos de tumores que expresan IL-1 α podría ser de un potencial valor terapéutico en el establecimiento de enfermedades humanas y puede representar una diana terapéutica eficaz para numerosas formas de cáncer bien en fases tempranas o avanzadas de la enfermedad.

Se ha informado en otros sitios que tanto como el 20% de las personas analizadas tienen un anticuerpo neutralizador IL-1 α en sus sueros. Además, se informa de que estas personas están sanas durante los prolongados periodos de observación. Similarmente, los ratones knockout IL-1 α están sin ningún fenotipo aparente (Horai y col. J. Exp. Med. 1998 187:1463-1475). Finalmente, se ha informado en otros sitios (Svenson y col.) que los animales pueden inmunizarse de manera simple y eficaz con IL-1 α para inducir respuestas potentes y neutralizadoras de los anticuerpos frente a la citoquina. Estos hallazgos sugieren que una inmunoterapia activa, tal como una inmunización con IL-1 α para inducir un autoanticuerpo neutralizador, podría también ser un medio eficaz en el tratamiento de cáncer humano que expresa IL-1 α .

Ejemplo 5*Materiales y Procedimientos**Medición de títulos de anticuerpos anti- IL-1 α con ELISA*

5 IL-1 α humano o murino, respectivamente, se incuban en placas ELISA de 96 pocillos durante la noche, usando 0,5 μ g/ml con un volumen de 100 μ l por pocillo. Las placas se lavan después 4 veces con tampón fosfato salino (PBS) + 0,05% Tween 20, después se saturan con una solución bloqueadora que contiene 1% de albúmina de suero bovino (BSA) en PBS + 0,05% Tween 20. Se usan 200 μ l de este tampón bloqueador por pocillo durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Después las placas se lavan de nuevo 4 veces con PBS + 0,05% Tween 20 (PBST). Después se añaden 100 μ l de muestras de suero diluidas en serie (1:2 diluciones en PBST + 1%BSA) y se incuban durante una hora a temperatura ambiente o a 4 °C durante la noche. Las placas se lavan de nuevo 4 veces con PBST. A continuación se añade peroxidasa de rábano picante (HRP) unida con anticuerpo anti-Fc como un anticuerpo secundario (diluido 1:2000 en PBST con 1% BSA en 100 μ l por pocillo, 1 hora, temperatura ambiente). Humano: 0,2 μ l de IgG-HRP de cabra anti-humano en 400 μ l PBST + 1% BSA. Ratón: 0,5 μ l de IgG (H+L) HRP de cabra anti ratón. Después, las placas se lavan de nuevo 4 veces con PBST. La reacción de color se hace con tampón ABST (3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfúrico, Sigma Cat. N° A-1888, 150 mg, 0,1 M ácido cítrico, anhidro Fisher, Cat. N° A-940, 500 ml, Ajustar pH a 4,35 con gránulos de NaOH, Alícuota en 11 ml por vial y almacenar a -20 °C, 40% SDS (80 g SDS en 200 ml dd H₂O), Añadir 200 ml DMF (N,N-dimetil formamida). Se añadieron 100 μ l del tampón ABST a cada pocillo. La reacción se para añadiendo 100 μ l de solución 2% ácido oxálico cuando es visible un buen contraste. La densidad óptica se mide después con un lector ELISA en una longitud de onda de 405 nm.

20 *Control de animales durante la prueba de desafío del tumor*

La salud de los animales se registró controlando su apariencia, su ingesta de comida y agua, su comportamiento natural así como el comportamiento provocado usando el siguiente sistema de puntuación: Puntuación 0: sin desviación de lo normal; Puntuación 1: desviación leve de lo normal; Puntuación 2: desviación moderada de lo normal; Puntuación 3: desviación sustancial de lo normal. Si se puntúa 3 más de una vez, se da un extra 1 a cada uno, haciendo una máxima puntuación de 15. Puntuación 0-3: Normal. Puntuación 4-7: Control con cuidado. Puntuación 8-15: El animal está sufriendo. Se practica la eutanasia al animal. A los animales también se les practicó la eutanasia cuando tuvieron una pérdida de peso corporal de más del 15% o cuando la temperatura corporal descendió más de 3,0 °C.

Líneas celulares tumorales

30 Las células EL-4 se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas VA, USA). EL-4 se estableció a partir de un linfoma inducido en un ratón C57BL/6 por 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno. Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco con 4 mM L-glutamina ajustada para contener 1,5 g/L de bicarbonato de sodio y 4,5 g/L de glucosa, 90%; suero fetal bovino, 10%.

35 Las células PC-3 se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA, USA). La línea de células PC-3 se inició a partir de una metástasis ósea de un adenocarcinoma prostático en grado IV de un varón caucásico de 62 años. La línea celular se cultivó usando medio F12K de Ham con 2 mM L-glutamina ajustada para contener 1,5 g/L de bicarbonato de sodio, 90%; suero fetal bovino, 10%.

Inmunización de ratones con IL-1 α e IL-1 β conjugado con PPD

40 IL-1 α e IL-1 β se obtuvieron de eBioscience (San Diego, CA). PPD se obtuvo del Instituto de Suero Statens (Copenhague, Dinamarca). El procedimiento para la conjugación se adaptó a partir de Svenson y col. (Svenson M. 2000). IL-1 α e IL-1 β se incubaron durante 48 horas a 4° C con PPD en una proporción de 0,41 p/p y en presencia de 0,1% de glutaraldehído (IL-1/PPD = 0,41). Como un control, PPD se trató en paralelo sin IL-1 α o IL-1 β . Después el conjugado se adsorbió a Al(OH)₃ (Rehydragel; Reheis Chemical, Dublín, Irlanda) para que hubiera 1,5% de Al(OH)₃ en el volumen final. La incubación con Alumbre duró 90 minutos a temperatura ambiente. Las partículas se lavaron después con 0,9% NaCl y se resuspendieron en 0,9% NaCl en una suspensión de 11 μ g de IL-1 α /100 μ l, asumiendo un 70% de adsorción de IL-1 α a Al(OH)₃ (encontrada en los estudios pilotos que usaron ¹²⁵I- IL-1 α). El conjugado IL-1 β se preparó de la misma manera. Las suspensiones control se diluyeron idénticamente para coincidir con la cantidad de PPD en el conjugado IL-1 α -PPD. Los conjugados se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Ejemplo 650 *Generación de una respuesta de anticuerpo anti-IL-1 α en ratones C57BL/6*

Como el sistema inmune es tolerante frente a las autoproteínas tales como citoquinas, sin embargo, tal vacunación activa tiene que romper la autotolerancia. En el caso de la mayoría de las autoproteínas la tolerancia inmune está provocada por una falta de células T específicas como consecuencia de la selección negativa en el timo. En cambio, las células B potencialmente autoreactivas normalmente están presentes. Cuando se inyecta la autoproteína como IL-1 α sola, estas células B no responden, debido a la falta de ayuda de célula T. Uniendo una proteína externa tal

como PPD al autoantígeno IL-1 α , se proporciona la ayuda de la célula T para la estimulación de la célula B, porque las células T reconocen PPD que da como resultado la producción de anticuerpos de células B estimuladas frente a IL-1 α y PPD. Por lo tanto, los presentes inventores vacunaron a los ratones con un conjugado IL-1 α -PPD en alumbre para asegurar una ayuda eficaz de célula T para las células B específicas de IL-1 β . Los títulos de los anticuerpos se determinaron mediante ELISA. Los grupos de 5 ratones recibieron inmunizaciones subcutáneas con 15 μ g de IL-1 α recombinante conjugado con 10 μ g-PPD usando una etapa de incubación con glutaraldehído. El conjugado IL-1 α -PPD se adsorbió después al alumbre. Los ratones recibieron tres inmunizaciones subcutáneas en un intervalo de tiempo de 2 semanas.

Los ratones inmunizados produjeron títulos altos de anticuerpos anti-IL-1 α , mientras que los ratones control inmunizados con PPD en alumbre fallaron al inducir títulos detectables de anticuerpos (Fig. 2). La inducción de anticuerpos anti-IL-1 α requirió al menos 2 inyecciones. Después de solamente la primera inyección del conjugado recombinante IL-1 α -PPD en alumbre no se detectó ninguna respuesta de anticuerpo en el suero. Pero después de una tercera inyección del conjugado recombinante IL-1 α -PPD en alumbre todos los ratones vacunados produjeron anticuerpos anti-IL-1 α .

Ejemplo 7

La inmunización activa frente a IL-1 α protege a los ratones frente al desafío de tumor con EL-4

Los ratones C57BL/6 se inmunizaron activamente mediante tres inyecciones de 15 μ g de IL-1 α murino conjugado con 10 μ g PPD en alumbre los días 0, 14 y 28 a través de administración subcutánea en la región del cuello. El volumen de la inyección fue 100 μ l, y la cantidad de hidróxido de aluminio fue aproximadamente 1 mg. Los ratones control se trataron de manera similar pero con una preparación que contenía la misma cantidad de PPD y de hidróxido de aluminio pero que no contenía IL-1 α . La sangre de la vena de la cola se muestreó los días 0, 28, 42 y 56 con el fin de confirmar la formación de respuestas de anticuerpo anti-IL-1 α mediante ELISA. El día 56 después de la primera inmunización, todos los ratones recibieron un inóculo de 1.000 células de linfoma EL-4. Posteriormente, los ratones se observaron diariamente durante las siguientes cuatro semanas. Con la primera aparición de signos de enfermedad, a los ratones se les practicó eutanasia para cuantificación macroscópica e histológica del crecimiento tumoral y metástasis.

Después de 30 días tras el desafío de tumor, los ratones control mostraron signos de enfermedad debido a la progresión del tumor, como lo evidencia la metástasis diseminada macroscópicamente visible en los órganos viscerales. En cambio, ninguno de los ratones activamente inmunizados frente a IL-1 α mostró signos clínicos de enfermedad.

Ejemplo 8

La inmunización pasiva frente a IL-1 α protege frente al linfoma EL-4 de ratón

Los ratones C57BL/6 se inmunizaron activamente frente a IL-1 α con 3 inyecciones subcutáneas de conjugado IL-1 α -PPD en alumbre. Después de 56 días se recogió su suero y ELISA confirmó la generación de títulos de autoanticuerpos anti-IL-1 α . 200 μ l de tal suero se transfirió pasivamente a ratones C57BL/6 de 6 semanas de edad. Estas transferencias pasivas de suero se repitieron cada semana. Los ratones control C57BL/6 recibieron 200 μ l de suero de ratones C57BL/6 que no había sido tratados previamente con intervalos semanales. Junto con la primera transferencia de suero los ratones recibieron un inóculo de 1.000 células de linfoma EL-4. Posteriormente, los ratones se observaron diariamente durante las siguientes cuatro semanas. Con la primera aparición de signos de enfermedad, a los ratones se les practicó eutanasia para cuantificación macroscópica e histológica del crecimiento tumoral y metástasis.

Después de 30 días, los ratones control sucumbieron al tumor, como lo evidencia la metástasis diseminada macroscópicamente visible en los órganos viscerales. En cambio, ninguno de los ratones que recibieron la transferencia pasiva de suero con antisuero policlonal anti-IL-1 α mostró signos clínicos de enfermedad.

Ejemplo 9

La inmunización pasiva frente a IL-1 α protege a los ratones SCID frente a tumor xenoinjertado PC-3

Los ratones C57BL/6 se inmunizaron activamente frente a IL-1 α con 3 inyecciones subcutáneas de conjugado IL-1 α -PPD en alumbre. Después de 56 días se recogió su suero y ELISA confirmó la generación de títulos de autoanticuerpos anti-IL-1 α . 200 μ l de tal suero se transfirió pasivamente a ratones hembras SCID de 6 semanas de edad. Estas transferencias pasivas de suero se repitieron cada semana. Los ratones control SCID recibieron 200 μ l de suero de ratones C57BL/6 que no había sido tratados previamente con intervalos semanales. Junto con la primera transferencia de suero los ratones recibieron un inóculo subcutáneo de 10⁷ células PC-3 en las ijadas. Los ratones con tumores palpables se identificaron cada semana.

Después de 30 días, los ratones control habían desarrollado tumores palpables en el lugar de la inoculación, mientras que ninguno de los ratones que había recibido la transferencia pasiva de suero con antisuero policlonal

anti-IL-1 α desarrolló un tumor palpable.

Ejemplo 10

ADCK – El complemento dependiente de anticuerpos medió la eliminación

5 Los ratones C57BL/6 se inmunizaron activamente frente a IL-1 α con 3 inyecciones subcutáneas de conjugado IL-1 α -PPD en alumbre. Después de 56 días se recogió su suero y ELISA confirmó la generación de títulos de autoanticuerpos anti-IL-1 α . Los sueros se inactivaron con calor. 50 μ l de suspensiones de célula EL-4 se colocaron en placas de 96 pocillos. A cada uno de estos pocillos se añadieron 15 μ l de diluciones en serie 1:2 del suero inactivado con calor. Las placas se incubaron después durante 20 minutos a 37 °C. Después se añadieron 25 μ l de suero bovino a cada pocillo. Después de otras 5 horas de incubación a 37 °C los pocillos se fotografía y después las
10 células se contabilizaron en una cámara de conteo usando azul tripán para distinguir las células muertas de las vivas.

El antisuero policlonal de ratón anti-ratón IL-1 α medió la eliminación complemento dependiente de células tumorales EL-4 de una manera dependiente de la concentración. Véase Figura 3.

REIVINDICACIONES

1. Los anticuerpos anti-IL-1 α para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente mamífero.
2. Los anticuerpos anti-IL-1 α de la reivindicación 1 en los que el paciente es un ser humano.
- 5 3. Los anticuerpos anti-IL-1 α de la reivindicación 1 en los que el paciente se selecciona del grupo que consiste en un ratón, un cerdo, una cabra, un perro, un gato y una oveja.
4. Los anticuerpos anti-IL-1 α de la reivindicación 1 en los que el cáncer es metastásico.
5. Los anticuerpos anti-IL-1 α de la reivindicación 1 en los que el cáncer es cáncer de mama o de próstata.
6. Los anticuerpos anti-IL-1 α de la reivindicación 1 en los que los anticuerpos son policlonales.
- 10 7. Los anticuerpos anti-IL-1 α de la reivindicación 1 en los que los anticuerpos son monoclonales.
8. Los anticuerpos anti-IL-1 α de la reivindicación 1 en los que los anticuerpos se seleccionan del grupo que consiste en Fab, F(ab')₂, scFv, Fv, diacuerpos, minicuerpos, cuerpos Kappa y Janusins.
9. IL-1 α para su uso en el tratamiento del cáncer, por el que el paciente genera autoanticuerpos IL-1 α .
10. IL-1 α de la reivindicación 9 en el que el paciente es un ser humano.

15

Figura 1A

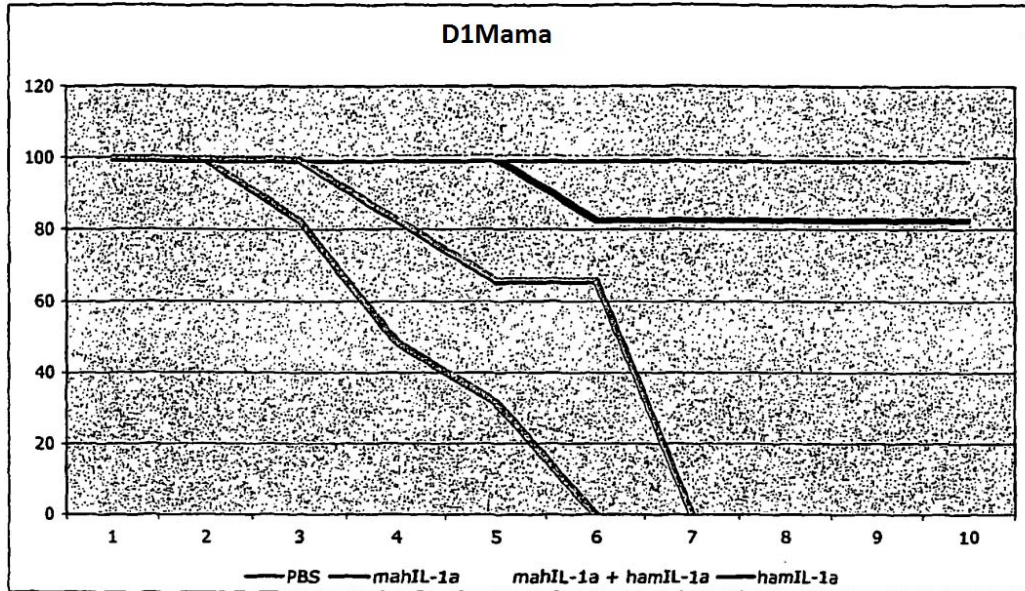


Figura 1B

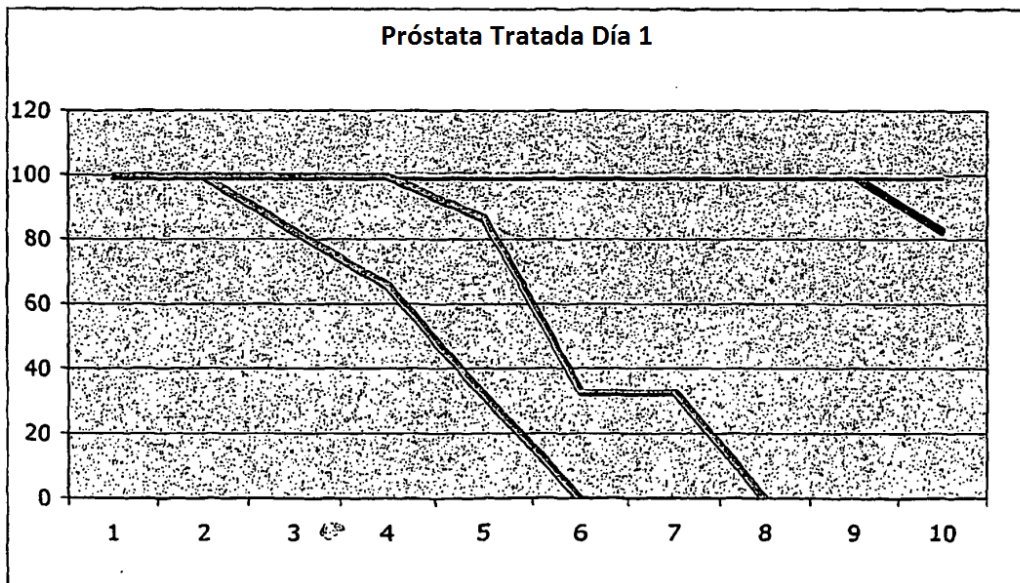


Figura 1C

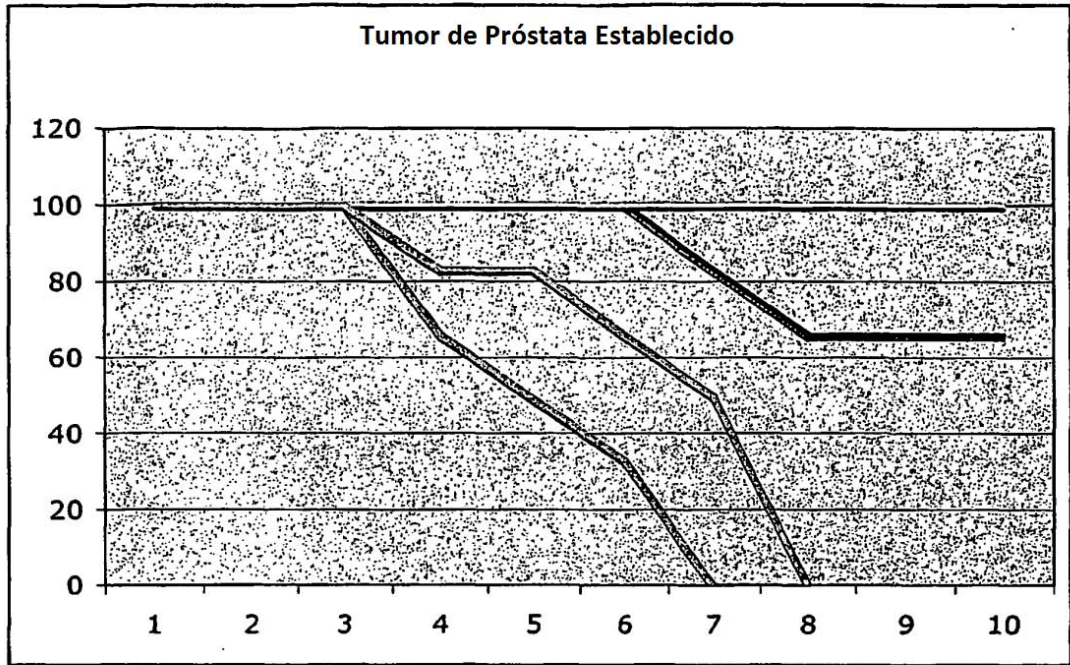


Figura 1D

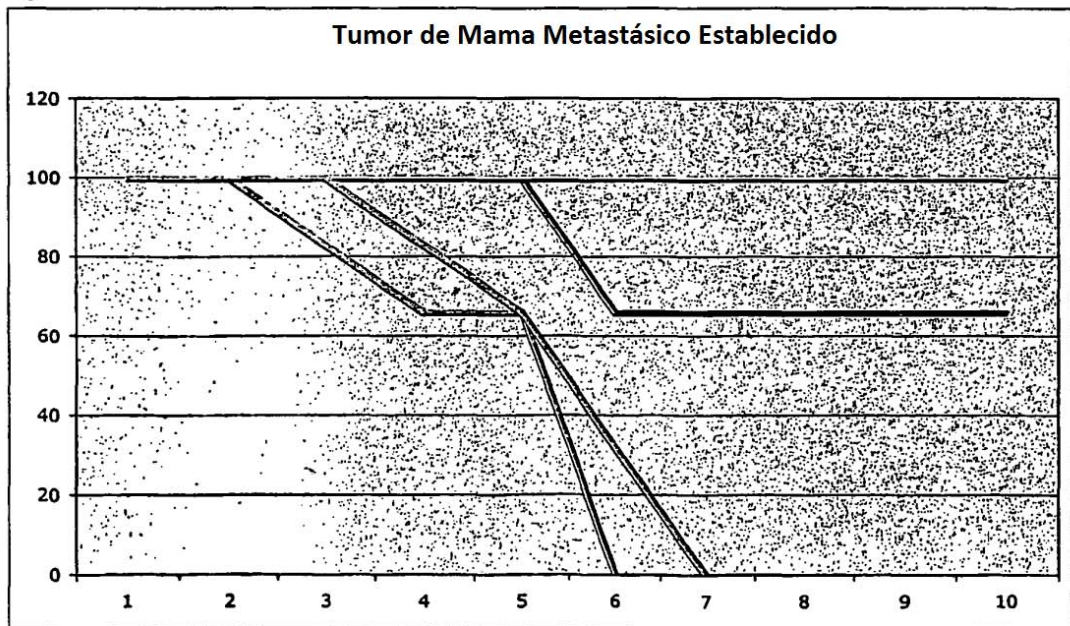


Figura 2

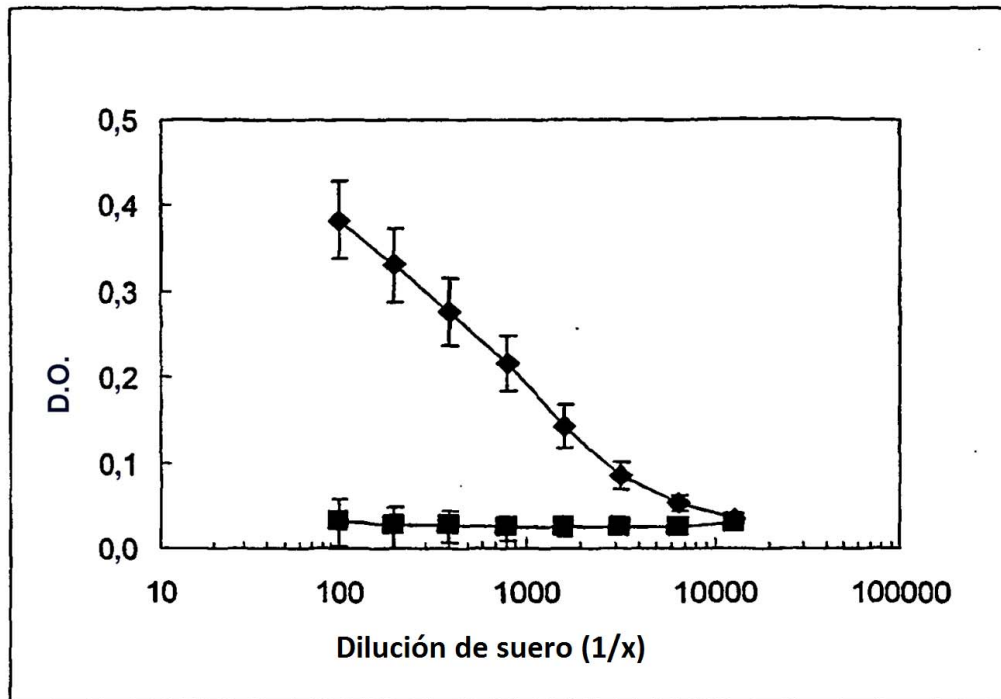


Figura 3

