

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 693**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2009 E 09759528 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2012 EP 2293816**

54 Título: **Métodos para el tratamiento de la artritis reumatoide**

30 Prioridad:

06.06.2008 US 59711 P

08.09.2008 US 95232 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

21.03.2013

73 Titular/es:

XOMA TECHNOLOGY LTD. (100.0%)

2910 Seventh Street

Berkeley, CA 94710

72 Inventor/es:

SOLINGER, ALAN, M. y

OWYANG, ALEXANDER

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 398 693 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

Métodos para el tratamiento de la artritis reumatoide.

Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere a métodos para el tratamiento y/o la prevención de la artritis reumatoide. Tales métodos pueden utilizarse para tratar a un individuo que la padece o para prevenir la aparición de la misma en un individuo que tiene riesgo de padecerla.

Antecedentes de la invención

10 La presente descripción se refiere a métodos para el tratamiento y/o la prevención de la artritis reumatoide (AR) en un individuo. Tales métodos se pueden utilizar para tratar a un individuo mamífero, tal como por ejemplo un ser humano, que padece artritis reumatoide o para prevenir la aparición de la misma en un individuo vulnerable. La AR es una enfermedad autoinmune crónica, multisistémica que puede ser debilitante y reduce la esperanza de vida. El sello distintivo de la enfermedad es una artritis inflamatoria persistente, por lo general de las articulaciones periféricas, que puede conducir a la destrucción del cartílago, la erosión del hueso y la pérdida de integridad articular. Además de los signos articulares de la AR, los pacientes presentan frecuentemente manifestaciones
15 extraarticulares de la enfermedad, que incluyen nódulos subcutáneos reumatoides, debilidad muscular y atrofia, vasculitis y pleuritis. El curso de la AR es muy variable, ya que algunos pacientes experimentan su potencial destructivo y muestran una acusada incapacidad funcional, mientras que otros experimentan una enfermedad leve de corta duración.

20 Un examen microscópico del revestimiento sinovial de las articulaciones de pacientes con AR revela un estado inflamatorio agudo y crónico que se caracteriza por la infiltración con predominio de linfocitos T CD4+. Se ha afirmado que el agotamiento de los linfocitos T mediante el drenaje del conducto torácico, la irradiación linfoide o los fármacos citotóxicos son eficaces en el tratamiento de la AR. Los linfocitos T producen un número de citocinas que favorecen la proliferación de linfocitos B y la diferenciación en células formadoras de anticuerpos/ presentadoras de antígenos. Un signo común, aunque no es específico, de dos tercios de los pacientes es la presencia de factores reumatoides, autoanticuerpos dirigidos contra la IgG. La producción de factores reumatoides puede conducir a la formación de complejos inmunes, la activación resultante del complemento y la intensificación del proceso inflamatorio (Lipsky, 1998). En la AR, el mecanismo de la enfermedad parece implicar la activación de los linfocitos T a través de antígenos todavía desconocidos. Estos antígenos pueden ser agentes infecciosos u otras moléculas endógenas que ya no son reconocidas como automoléculas. Los linfocitos T CD4+ activados con antígenos estimulan los monocitos, macrófagos y fibroblastos sinoviales para producir las citocinas IL-1, IL-6 y TNF- α . Estas citocinas proinflamatorias se consideran responsables de la persistencia del proceso inflamatorio en la articulación, incluyendo la destrucción del cartílago y la erosión del hueso periarticular. La inhibición de TNF- α e IL-1, ha demostrado que reduce la inflamación y retarda la destrucción de la articulación (Keystone y Strond, 2005).

35 La IL-1 es una citocina proinflamatoria secretada por una variedad de diferentes tipos de células, que incluyen los monocitos y los macrófagos. La familia génica de la IL-1 comprende las citocinas agonistas IL 1 alfa (IL-1 α e IL-1 β), y el antagonista natural del receptor (IL-1Ra). IL-1 α e IL-1 β se producen como precursores. ProIL-1 α es funcionalmente activa y debido a la falta del péptido líder, permanece en el citoplasma, mientras que proIL-1 β es inactiva y se secreta y se activa después de la escisión con una proteasa intracelular específica. En la enfermedad, IL-1 β se encuentra en la circulación mientras que IL-1 α rara vez se detecta; se libera solo en estados de enfermedad grave, muy probablemente como consecuencia de la muerte celular (Dinarello, 1996). Cuando se libera como parte de una reacción inflamatoria, IL-1 β produce una gama de efectos biológicos, principalmente a través de la inducción de otros mediadores inflamatorios, tales como corticotropina, factor plaquetario 4, prostaglandina E2 (PGE-2), IL-6 e IL-8. La IL-1 β induce efectos inflamatorios locales y sistémicos a través de la activación del receptor de IL-1 que se encuentra en casi todos los tipos de células nucleadas (Dinarello, 2005). La IL-1 β se une al receptor de IL-1 (IL-1R), induciendo un cambio conformacional que permite la unión de la proteína accesoria al complejo IL-1 β /IL-1R. Por lo tanto, la formación de este complejo induce la señalización intracelular a través de IL-1R (Dinarello, 1996).

40 La IL-1 está presente en el tejido sinovial y en los fluidos de pacientes con artritis reumatoide y estimula la producción de mediadores tales como prostaglandina E(2), óxido nítrico, citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión que están implicadas en la inflamación articular. Además, la IL-1 estimula la síntesis y la actividad de metaloproteinasas de la matriz y otras enzimas implicadas en la destrucción del cartílago en la artritis reumatoide y la osteoartritis. Los efectos de la IL-1 se inhiben *in vitro* e *in vivo* mediante inhibidores naturales, tales como el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) y receptores solubles. IL-1Ra pertenece a la familia IL-1 de las citocinas y se une a receptores de IL-1 pero no induce ninguna respuesta intracelular. IL-1Ra inhibe el efecto de la IL-1 bloqueando su interacción con receptores de la superficie celular. Los inhibidores de IL-1 se han utilizado en modelos experimentales de artritis reumatoide que apoyan el papel de la IL-1 en la patogénesis de la enfermedad.

55 Anakinra es una forma recombinante del bloqueador natural de IL-1, IL-1Ra. Anakinra se ha utilizado de forma extensa para la indicación aprobada de la AR, y también ha mostrado una actividad clínica significativa sobre la artritis idiopática juvenil sistémica (AIJs) y, en menor grado, sobre los otros subtipos de artritis idiopática juvenil (AIJ).

En la bibliografía reciente también se ha mostrado la actividad de anakinra sobre otros trastornos sistémicos mediados con la IL-1 (enfermedad multisistémica inflamatoria neonatal [NOMID], enfermedad de Muckle-Wells y síndrome familiar autoinflamatorio por frío), así como la osteoartritis de rodilla (Goupille, et al., 2003). Sin embargo, la dosificación frecuente de medicamentos inyectables, como anakinra, es en general no deseable y puede dar lugar a problemas con la conformidad del paciente, disminuyendo de este modo aún más la eficacia de esta modalidad de tratamiento o limitando su conveniencia. Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de medios eficaces para tratar la AR, en particular composiciones y métodos de tratamiento que no requieran inyecciones frecuentes (por ejemplo, diariamente).

Los actuales fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARMEs) son eficaces para controlar los síntomas inflamatorios. Los modificadores de la respuesta biológica, (BRMs) más nuevos ofrecen mejoras en el control de la enfermedad, pero con riesgos de seguridad adicionales. Estos riesgos aumentan con el uso prolongado, y algunos de los BRMs pierden su eficacia con el tiempo. En una evaluación reciente de 500 pacientes con AR realizada por la "Arthritis Foundation", se encontró que dos tercios de los pacientes con AR siguen sufriendo dolor diario, rigidez o cansancio a pesar del tratamiento con FARMEs o BRMs (Gruver, 2004). Sigue existiendo una necesidad insatisfecha de terapias para la AR que sean seguras y proporcionen un control a largo plazo de la enfermedad.

La presente descripción proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de la artritis reumatoide. Los métodos descritos en este documento comprenden, por ejemplo, la administración de un anticuerpo anti-IL-1 β de alta afinidad o un fragmento del mismo con regímenes de dosificación tal y como se describen en esta memoria. Los métodos que se dirigen directamente al ligando de IL-1 β con un anticuerpo, particularmente anticuerpos que muestran una afinidad elevada, pueden proporcionar ventajas sobre otros posibles métodos de tratamiento, tales como antagonistas del receptor de IL-1 β (por ejemplo, Anakinra). Un desafío para los agentes terapéuticos que se basan en antagonistas del receptor de IL-1 es la necesidad de que tales agentes terapéuticos ocupen un gran número de receptores, lo que es una tarea inmensa, ya que estos receptores se expresan ampliamente en todas las células excepto los glóbulos rojos (Dinarelo, Curr. Opin. Pharmacol. 4:378-385, 2004). En la mayoría de las enfermedades mediadas por el sistema inmune, tales como las enfermedades descritas en este documento, la cantidad de citocina IL-1 β que se puede medir en los fluidos corporales o que está asociada con células activadas es relativamente baja. Por lo tanto, un método de tratamiento y/o de prevención que se dirige directamente al ligando de IL-1 β debe proporcionar una estrategia superior, en particular cuando se administra un anticuerpo de IL-1 β que tiene afinidad elevada.

Alten et al., *Arthritis Research & Therapy*, 2008, 10(3), 1-9 menciona el anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β humano, ACZ885, en el contexto de modelos de inflamación articular en ratones y de un estudio de prueba de concepto en pacientes con artritis reumatoide.

El documento WO 2007/050807 A2 también menciona el anticuerpo anti-IL-1 β ACZ885 en el contexto de tratamiento de síndromes antiinflamatorios que incluyen la artritis reumatoide.

Geiger et al., *Clinical and Experimental Rheumatology*, 1993, 11, 515-522 describen anticuerpos anti-IL-1 β en el contexto de artritis inducida con colágeno en ratones DBA/1.

El documento WO 03/010282 A2 menciona anticuerpos monoclonales anti-IL-1 β en el contexto del tratamiento de artritis reumatoide.

El documento WO 2007/002261 A2 describe, entre otros, anticuerpos anti-IL-1 β de alta afinidad.

El documento 02/16436 A2 describe anticuerpos anti-IL-1 β en el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado con IL-1, tal como las artritis inflamatorias.

Compendio de la invención

La presente descripción se refiere a métodos y a artículos de fabricación relacionados para el tratamiento y/o la prevención de la artritis reumatoide en un individuo. Tales métodos pueden utilizarse para tratar un individuo mamífero (por ejemplo, humano) que padece o tiene riesgo de padecer artritis reumatoide. Los métodos también pueden usarse para evitar la aparición de la artritis reumatoide en un individuo con riesgo de padecerla. La descripción contempla además el uso de tales métodos para enfermedades o afecciones adicionales, tales como, por ejemplo, artritis idiopática juvenil sistémica. Tal y como se ilustra en los Ejemplos siguientes, se ha encontrado sorprendentemente que anticuerpos, tales como los descritos en esta memoria, se pueden utilizar para conseguir el nivel deseado de actividad con un intervalo amplio de dosis, incluso con dosis muy bajas.

En un aspecto de la descripción, se proporciona un método para el tratamiento de la artritis reumatoide en un individuo, comprendiendo el método la administración de un anticuerpo anti-IL-1 β o un fragmento del mismo al individuo, en donde la administración de una dosis inicial del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo, está seguida por la administración de una o varias dosis posteriores, y en donde la dosis inicial y cada dosis o las dosis posteriores se administran en un intervalo desde una vez a la semana hasta una vez cada seis meses. En una realización, la dosis inicial y cada dosis o varias dosis posteriores se administran en un intervalo desde una vez cada

dos semanas hasta una vez cada tres meses. En otra realización, la dosis inicial y cada dosis o las dosis posteriores se administran en un intervalo desde una vez cada dos semanas hasta una vez cada dos meses. En otra realización, la dosis inicial y cada dosis o las dosis posteriores se administran en un intervalo desde una vez al mes hasta una vez cada tres meses. En otra realización, la dosis inicial y cada dosis o las dosis posteriores se administran en un intervalo desde una vez al mes hasta una vez cada dos meses. En aún otra realización, la dosis inicial y cada dosis o las dosis posteriores se administran en un intervalo desde una vez al mes hasta una vez cada tres meses o más.

Los anticuerpos anti-IL-1 β o los fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos que se unen) que se utilizan en los métodos de la presente descripción, generalmente se unen a IL-1 β con afinidad elevada. En realizaciones preferidas, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se une a IL-1 β con una constante de disociación de aproximadamente 10 nM o menor, aproximadamente 5 nM o menor, aproximadamente 1 nM o menor, aproximadamente 500 pM o menor, aproximadamente 250 pM o menor, aproximadamente 100 pM o menor, aproximadamente 50 pM o menor o aproximadamente 25 pM o menor. En realizaciones particularmente preferidas, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se une a la IL-1 β humana con una constante de disociación de aproximadamente 500 pM o menor, aproximadamente 250 pM o menor, aproximadamente 100 pM o menor, aproximadamente 50 pM o menor, aproximadamente 10 pM o menor, aproximadamente 5 pM o menor, aproximadamente de 3 pM o menor, aproximadamente 1 pM o menor, aproximadamente 0,75 pM o menor, aproximadamente 0,5 pM o menor, aproximadamente 0,3 pM o menor, aproximadamente 0,2 pM o menor o aproximadamente 0,1 pM o menor.

En otro aspecto de la descripción, el anticuerpo anti-IL-1 β o el fragmento de anticuerpo es un anticuerpo neutralizante. En otro aspecto, el anticuerpo anti-IL-1 β o el fragmento de anticuerpo se unen a un epítipo de IL-1 β de modo que el anticuerpo o el fragmento unido permiten sustancialmente la unión de IL-1 β con el receptor I de IL-1 (IL-1RI). En otro aspecto, el anticuerpo anti-IL-1 β o el fragmento de anticuerpo se une a IL-1 β , pero no impide sustancialmente que IL-1 β unida se una al receptor I de IL-1 (IL-1RI). En otro aspecto, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo no se une de forma detectable a IL-1 α , IL-1R o IL-1Ra. En aún otro aspecto de la descripción, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se une a un epítipo contenido en la secuencia ESVDPKNYPKMKMEKRFVFNKIE (SEQ ID NO: 1). En otro aspecto, el anticuerpo o el fragmento del mismo compite en la unión con un anticuerpo que tiene la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 6.

En una realización, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo comprende 1, 2 o 3 de las secuencias CDRs de SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 o SEQ ID NO. 6. En otra realización, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo comprenden una secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO. 3 o SEQ ID NO. 5. En otra realización, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO. 4 o SEQ ID NO. 6. En una realización, el anticuerpo o el fragmento del mismo comprende una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 6. En aún otro aspecto de la descripción, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se une a un epítipo que incorpora Glu64 de IL-1 β . En aún otro aspecto de la descripción, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se une a los aminoácidos 1-34 del extremo N-terminal de IL-1 β . Preferiblemente, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es humano modificado genéticamente, humanizado o humano.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para el tratamiento de la artritis reumatoide en un individuo (por ejemplo, mamífero, ser humano), comprendiendo el método la administración de un anticuerpo anti-IL-1 β o un fragmento del mismo al ser humano, en donde a la administración de una dosis inicial de anticuerpo de IL-1 β o de un fragmento de anticuerpo está seguida por la administración de una o varias dosis posteriores. En una realización, la administración de una dosis inicial del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo está seguida por la administración de dos o varias dosis posteriores. En otra realización, la administración de una dosis inicial del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo está seguida por la administración de una o varias dosis posteriores, y en donde dicha una o varias dosis posteriores son una cantidad que es aproximadamente la misma o menor que la dosis inicial. En otra realización, la administración de una dosis inicial del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo está seguida por la administración de una o varias dosis posteriores, y en donde al menos una de las dosis posteriores es una cantidad que es superior a la dosis inicial.

En una realización, se administran dos o más dosis, tres o más dosis, cuatro o más dosis, cinco o más dosis, seis o más dosis, siete o más dosis, ocho o más dosis, nueve o más dosis, diez o más dosis u once o más dosis posteriores del anticuerpo. En otra realización, la administración de la dosis inicial y cada una o más de las dosis posteriores se separan entre sí con un intervalo de al menos aproximadamente dos semanas, al menos aproximadamente tres semanas, al menos aproximadamente un mes, al menos aproximadamente dos meses, al menos aproximadamente tres meses, al menos aproximadamente cuatro meses, al menos aproximadamente cinco meses, al menos aproximadamente seis meses, al menos aproximadamente siete meses, al menos aproximadamente ocho meses, al menos aproximadamente nueve meses, al menos aproximadamente diez meses, al menos aproximadamente once meses o al menos aproximadamente doce meses.

En otra realización, el anticuerpo o el fragmento se administran en una o varias dosis de 5 mg/kg o menos de anticuerpo o de fragmento, 3 mg/kg o menos de anticuerpo o de fragmento, 2 mg/kg o menos de anticuerpo o de

fragmento, 1 mg/kg o menos de anticuerpo o de fragmento, 0,75 mg/kg o menos de anticuerpo o de fragmento, 0,5 mg/kg o menos de anticuerpo o de fragmento, 0,3 mg/kg o menos de anticuerpo o de fragmento, 0,1 mg/kg o menos de anticuerpo o de fragmento, 0,03 mg/kg o menos de anticuerpo o de fragmento, 0,01 mg/kg o menos de anticuerpo o de fragmento, 0,003 mg/kg o menos de anticuerpo o de fragmento o 0,001 mg/kg o menos de anticuerpo o de fragmento. Preferiblemente, en cada una de las realizaciones mencionadas anteriormente, el anticuerpo o el fragmento se administran en una o varias dosis de al menos 0,01 mg/kg de anticuerpo o de fragmento, al menos 0,01 mg/kg de anticuerpo o de fragmento o al menos 0,03 mg/kg de anticuerpo o de fragmento. Preferiblemente, el anticuerpo o el fragmento se administran en una o varias dosis de 0,001 mg/kg a 1 mg/kg, 0,001 mg/kg a 0,3 mg/kg, 0,003 mg/kg a 1 mg/kg, 0,003 mg/kg a 0,3 mg/kg. Las cantidades anteriores de dosificación se refieren a mg (de anticuerpo o de fragmento)/kg (peso del individuo a tratar).

En otra realización, la dosis inicial y una o varias dosis posteriores de anticuerpo o de fragmento son cada una desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg de anticuerpo, desde aproximadamente 0,03 a aproximadamente 1 mg/kg de anticuerpo, desde aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,3 mg/kg de anticuerpo, desde aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5 mg/kg de anticuerpo, desde aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg de anticuerpo, desde aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg de anticuerpo, desde aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg de anticuerpo, desde aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 0,5 mg/kg de anticuerpo, desde aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg de anticuerpo, desde aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg de anticuerpo, desde aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg de anticuerpo, desde aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg de anticuerpo, desde aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg de anticuerpo, desde aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg de anticuerpo, desde aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg de anticuerpo o desde aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg de anticuerpo. En ciertas realizaciones, se administran dos o más dosis, tres o más dosis, cuatro o más dosis, cinco o más dosis, seis o más dosis, siete o más dosis, ocho o más dosis, nueve o más dosis, diez o más dosis u once o más dosis posteriores del anticuerpo. Las cantidades anteriores de dosificación se refieren a mg (de anticuerpo o de fragmento)/kg (peso del individuo a tratar). Lo mismo se aplica en lo sucesivo, si se menciona una cantidad de dosificación.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para tratar la artritis reumatoide en un individuo (por ejemplo, ser humano), en donde el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-IL-1 β o de un fragmento del mismo al individuo en forma de una dosis inicial de aproximadamente 5 mg/kg o menos de anticuerpo o de fragmento, 3 mg/kg o menos de anticuerpo o de fragmento, 2 mg/kg o menos de anticuerpo o de fragmento, 1 mg/kg o menos de anticuerpo o de fragmento, 0,75 mg/kg o menos de anticuerpo o de fragmento, 0,5 mg/kg o menos de anticuerpo o de fragmento, 0,3 mg/kg o menos de anticuerpo o de fragmento, 0,1 mg/kg o menos de anticuerpo o de fragmento o 0,03 mg/kg o menos de anticuerpo o de fragmento, y una pluralidad de dosis posteriores de anticuerpo o de fragmento en una cantidad aproximadamente igual o inferior a la dosis inicial.

Preferiblemente, en las realizaciones mencionadas anteriormente en donde el anticuerpo o el fragmento se administra como una dosis inicial y una pluralidad de dosis posteriores, la dosis de anticuerpo o de fragmento es de al menos 0,001 mg/kg de anticuerpo o de fragmento, al menos 0,003 mg/kg de anticuerpo o de fragmento, al menos 0,01 mg/kg de anticuerpo o de fragmento, al menos 0,03 mg/kg de anticuerpo o de fragmento, al menos 0,05 mg/kg de anticuerpo o de fragmento o al menos 0,09 mg/kg de anticuerpo o de fragmento.

En otro aspecto de la presente descripción, el anticuerpo o el fragmento se administra como una dosis fija, independientemente de una relación entre la dosis y el peso del individuo. En una realización, el anticuerpo o el fragmento se administra en una o varias dosis fijas de 1000 mg o menos de anticuerpo o de fragmento, 750 mg o menos de anticuerpo o de fragmento, 500 mg o menos de anticuerpo o de fragmento, 250 mg o menos de anticuerpo o de fragmento, 100 mg o menos de anticuerpo o de fragmento, aproximadamente 25 mg o menos de anticuerpo o de fragmento, aproximadamente 10 mg o menos de anticuerpo o de fragmento o aproximadamente 1,0 mg o menos de anticuerpo o de fragmento. En otra realización, el anticuerpo o el fragmento se administra en una o varias dosis fijas de al menos aproximadamente 0,1 mg de anticuerpo o de fragmento, al menos aproximadamente 1 mg de anticuerpo o de fragmento, al menos aproximadamente 5 mg de anticuerpo o de fragmento o al menos aproximadamente 10 mg de anticuerpo o fragmento.

En ciertas realizaciones, la dosis fija es desde aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg, desde aproximadamente 1 mg a aproximadamente 25 mg, desde aproximadamente 10 mg a aproximadamente 25 mg, desde aproximadamente 10 mg a aproximadamente 50 mg, desde aproximadamente 10 mg a aproximadamente 100 mg, desde aproximadamente 25 mg a aproximadamente 50 mg, desde aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg, desde aproximadamente 50 mg a aproximadamente 100 mg, desde aproximadamente 50 mg a aproximadamente 150 mg, desde aproximadamente 100 mg a aproximadamente 150 mg, desde aproximadamente 100 mg a aproximadamente 200 mg, desde aproximadamente 150 mg a aproximadamente 200 mg, desde aproximadamente 150 mg a aproximadamente 250 mg, desde aproximadamente 200 mg a aproximadamente 250 mg, desde aproximadamente 200 mg a aproximadamente 300 mg, desde aproximadamente 250 mg a aproximadamente 300 mg a aproximadamente 400 mg, desde aproximadamente 250 mg a aproximadamente 500 mg, desde aproximadamente 300 mg a aproximadamente 400 mg, desde aproximadamente 400 mg a aproximadamente 500 mg, desde

aproximadamente 400 mg a aproximadamente 600 mg, desde aproximadamente 500 mg a aproximadamente 750 mg, desde aproximadamente 600 mg a aproximadamente 750 mg, desde aproximadamente 700 mg a aproximadamente 800 mg, desde aproximadamente 750 mg a aproximadamente 1000 mg. En una realización preferida, la dosis fija se administra en una o varias dosis desde aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 100 mg, desde aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 100 mg o desde aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 50 mg. En otra realización preferida, la dosis fija se selecciona entre el grupo que consiste en desde aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg, desde aproximadamente 1 mg a aproximadamente 25 mg, desde aproximadamente 10 mg a aproximadamente 25 mg, desde aproximadamente 10 mg a aproximadamente 100 mg, desde aproximadamente 25 mg a aproximadamente 50 mg, desde aproximadamente 50 mg a aproximadamente 100 mg, desde aproximadamente 100 mg a aproximadamente 150 mg, desde aproximadamente 150 mg a aproximadamente 200 mg, desde aproximadamente 200 mg a aproximadamente 250 mg.

En un aspecto de la descripción, se proporciona un método mencionado anteriormente para tratar la artritis reumatoide, en un individuo, en donde la dosis del anticuerpo o del fragmento es suficiente para lograr una mejora en uno o varios criterios esenciales de respuesta según la escala de ACR (American College of Rheumatology). En otro aspecto, la dosis del anticuerpo o del fragmento es suficiente para lograr al menos una reducción del 50% del dolor articular, al menos un 60% de reducción del dolor articular, al menos un 70% de reducción del dolor articular, al menos un 80% de reducción del dolor articular, al menos un 90% de reducción del dolor articular, al menos un 95% de reducción del dolor articular o una reducción del 100% del dolor articular.

En otro aspecto de la descripción, la dosis del anticuerpo o del fragmento es suficiente para lograr al menos una mejora del 20% en la puntuación ACR 50, por lo menos una mejora del 30% en la puntuación ACR 50, por lo menos una mejora del 40% en la puntuación ACR 50 o por lo menos una mejora del 50% en la puntuación ACR 50.

En una realización, las mejoras mencionadas anteriormente son de 3 meses o más, de 4 meses o más, de 5 meses o más, de 6 meses o más, de 9 meses o más o de 12 meses o más.

En otro aspecto, la dosis de anticuerpo o de fragmento es suficiente para lograr cualquiera de las mejoras mencionadas anteriormente y al menos una de las siguientes: disminución de la infiltración inflamatoria, disminución de la pérdida de cartilago, disminución de la resorción ósea, mejora en la puntuación radiográfica. En una realización, la mejora en la puntuación radiográfica se determina por rayos X. En otra realización, la mejora es una tasa más lenta de deterioro. En otra realización, la mejora es un deterioro no detectable.

En otra realización, la dosis del anticuerpo o del fragmento es suficiente para lograr por lo menos una disminución del 20% de los niveles de CRP, al menos un 30% de disminución de los niveles de CRP, al menos un 40% de disminución de los niveles de CRP, al menos una disminución de 50% de los niveles de CRP, al menos una disminución del 60% de los niveles de CRP, al menos un 70% de disminución de los niveles de CRP, al menos una disminución del 80% de los niveles de CRP, al menos una disminución del 90% de los niveles de CRP. En otra realización, la dosis del anticuerpo o del fragmento es suficiente para lograr al menos una disminución del 20% de ESR, al menos una disminución del 40% de ESR, por lo menos una disminución del 60% de ESR, al menos una disminución del 70% de ESR, al menos una disminución de 80% de ESR, al menos una disminución del 90% de ESR.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para tratar la artritis reumatoide en un individuo, en donde el método comprende la administración al individuo de un anticuerpo anti-IL-1 β o un fragmento del mismo, en donde la dosis del anticuerpo o del fragmento es suficiente para lograr una mejora en la puntuación ACR, al menos una disminución del 20% de CRP y al menos una disminución del 20% de ESR. En una realización, la dosis del anticuerpo o del fragmento es suficiente para lograr una mejora en la puntuación ACR, al menos una disminución del 30% de CRP y una disminución del 30% de ESR. En otra realización, la dosis del anticuerpo o del fragmento es suficiente para lograr una mejora en la puntuación ACR, al menos una disminución del 40% de CRP y una disminución del 40% de ESR.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para tratar la artritis reumatoide en un individuo, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-IL-1 β o un fragmento del mismo al individuo, en donde la administración de un dosis inicial del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo está seguida por la administración de una o varias dosis posteriores, y en donde la concentración plasmática de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo en el ser humano puede descender por debajo de un nivel de aproximadamente 0,1 μ g/ml durante un período de tiempo superior a aproximadamente 1 semana y menos de aproximadamente 6 meses entre administraciones, durante un curso de tratamiento con dicha dosis inicial y una o varias dosis posteriores. En una realización, la concentración plasmática de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede descender por debajo de un nivel de aproximadamente 0,07 μ g/ml, aproximadamente 0,05 μ g/ml, aproximadamente 0,03 μ g/ml o aproximadamente 0,01 μ g/ml durante un periodo de tiempo superior a aproximadamente 1 semana y menor de aproximadamente 5 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 3 semanas o aproximadamente de 2 semanas, entre las administraciones. En una realización, estos valores plasmáticos se refieren a valores obtenidos en un individuo que se trata con el anticuerpo o el fragmento de acuerdo con la descripción. En una realización, dicho individuo puede ser un paciente que padece artritis reumatoide.

La presente descripción contempla que un anticuerpo anti-IL-1 β o un fragmento empleado de acuerdo con los métodos del presente documento, se puede administrar en cualquiera de las cantidades de dosis, del número de administraciones posteriores y de los intervalos de dosificación entre las administraciones mencionados anteriormente, y que cualquiera de las cantidades de dosis, del número de administraciones posteriores y de los intervalos de dosificación entre administraciones descritos se pueden combinar entre sí en regímenes alternativos para modular el beneficio terapéutico. En ciertas realizaciones, la cantidad de una o varias dosis posteriores es una cantidad que es aproximadamente la misma o menor que la de la primera dosis administrada. En otra realización, la cantidad de una o varias dosis posteriores es una cantidad que es aproximadamente superior a la de la primera dosis administrada. Preferiblemente, el anticuerpo anti-IL-1 β o el fragmento se administran mediante inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa. La descripción contempla que cada dosis de anticuerpo o de fragmento se puede administrar en uno o varios sitios.

En una realización, el anticuerpo anti-IL-1 β o el fragmento se administra en combinación con al menos otro tratamiento para la enfermedad, trastorno o complicación aceptada médicamente. En otra realización, el, al menos otro, tratamiento aceptado médicamente para la enfermedad, el trastorno o la complicación se reduce o se interrumpe, mientras que el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-1 β o el fragmento se mantiene con un régimen de dosificación constante. En otra realización, el, al menos otro, tratamiento aceptado médicamente para la enfermedad, el trastorno o la complicación se reduce o se interrumpe, y el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-1 β o el fragmento se reduce. En otra realización, el, al menos otro, tratamiento aceptado médicamente para la enfermedad, el trastorno o la complicación se reduce o se interrumpe, y el tratamiento con anticuerpo anti-IL-1 β o el fragmento se incrementa. En aún otra realización, el, al menos otro, tratamiento aceptado médicamente para la enfermedad, el trastorno o la complicación se mantiene y el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-1 β o el fragmento se reduce o se interrumpe. En aún otra realización, el, al menos otro, tratamiento aceptado médicamente para la enfermedad, el trastorno o la complicación y el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-1 β o el fragmento se reducen o se interrumen.

En otro aspecto, los métodos proporcionados en este memoria se ofrecen en combinación con al menos un método de tratamiento adicional, comprendiendo dicho método de tratamiento adicional administrar al menos una composición farmacéutica que comprende un agente activo distinto de un anticuerpo o de un fragmento de IL-1 β . En aún otro aspecto, los métodos evitan o retrasan la necesidad de al menos un método de tratamiento adicional, comprendiendo dicho método de tratamiento adicional administrar al menos una composición farmacéutica que comprende un agente activo distinto de un anticuerpo o de un fragmento de IL-1 β . En todavía otro aspecto, los métodos reducen la cantidad, la frecuencia o la duración de al menos un método de tratamiento adicional, comprendiendo dicho método de tratamiento adicional administrar al menos una composición farmacéutica que comprende un agente activo distinto de un anticuerpo o de un fragmento de IL-1 β . En aún otra realización, el tratamiento con al menos un agente activo se mantiene. En otra realización, el tratamiento con, al menos uno, agente activo se reduce o se interrumpe, mientras que el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-1 β o el fragmento se mantiene con un régimen de dosificación constante. En otra realización, el tratamiento con al menos un agente activo se reduce o se interrumpe y el tratamiento con el anticuerpo o el fragmento anti-IL-1 β se reduce. En otra realización, el tratamiento con al menos un agente activo se reduce o se elimina, y el tratamiento con el anti-IL-1 β anticuerpo o el fragmento se incrementa. En aún otra realización, el tratamiento con, al menos uno, agente activo se mantiene y el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-1 β o el fragmento se reduce o se interrumpe. En aún otra realización, el tratamiento con al menos un agente activo y el tratamiento con el anticuerpo o el fragmento anti-IL-1 β se reducen o se interrumen.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para tratar la artritis reumatoide en un individuo, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-IL-1 β o un fragmento del mismo al individuo, en donde la administración de una dosis inicial del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo está seguida por la administración de una o varias dosis posteriores, y en donde la concentración plasmática de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo en el ser humano se mantiene a un nivel de al menos aproximadamente 0,03 $\mu\text{g/ml}$, al menos aproximadamente 0,05 $\mu\text{g/ml}$, al menos aproximadamente 0,08 $\mu\text{g/ml}$, al menos aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/ml}$, al menos aproximadamente 0,15 $\mu\text{g/ml}$, al menos aproximadamente 0,2 $\mu\text{g/ml}$, al menos aproximadamente 0,25 $\mu\text{g/ml}$, al menos aproximadamente 0,3 $\mu\text{g/ml}$, al menos aproximadamente 0,4 $\mu\text{g/ml}$, al menos aproximadamente 0,5 $\mu\text{g/ml}$, al menos aproximadamente 0,6 $\mu\text{g/ml}$, al menos aproximadamente 0,8 $\mu\text{g/ml}$, al menos aproximadamente 1 $\mu\text{g/ml}$, al menos aproximadamente 1,5 $\mu\text{g/ml}$, al menos aproximadamente 2 $\mu\text{g/ml}$, al menos aproximadamente 3 $\mu\text{g/ml}$, al menos aproximadamente 4 $\mu\text{g/ml}$ o al menos aproximadamente 5 $\mu\text{g/ml}$ durante un curso de tratamiento con dicha dosis inicial y una o varias dosis posteriores. En una realización, estos valores plasmáticos se refieren a valores obtenidos para un individuo que se está tratando con el anticuerpo o el fragmento de acuerdo con la descripción. En una realización, dicho individuo puede ser un paciente que padece artritis reumatoide.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para tratar la artritis reumatoide en un individuo, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-IL-1 β o un fragmento del mismo al individuo, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo tiene una CI_{50} menor que un antagonista del receptor de IL-1 β en un ensayo de inhibición de IL-1 β en sangre completa humana que mide la producción de IL-8 inducida con IL-1 β . En una realización, el anticuerpo o el fragmento tiene una CI_{50} que es menor de aproximadamente 90%, 80%, 70%, 60%, 50% de la CI_{50} de un antagonista del receptor de IL-1 β en un ensayo de

inhibición de IL-1 β en sangre completa humana que mide la producción de IL-8 inducida con IL-1 β . En una realización adicional, el anticuerpo o el fragmento tiene una CI₅₀ que es menor de aproximadamente 40%, 30%, 20%, 10% de la CI₅₀ de un antagonista del receptor de IL-1 β en un ensayo de inhibición de IL-1 β en sangre completa humana que mide la producción de IL-8 inducida con IL-1 β . En una realización preferida, el anticuerpo o el fragmento tiene una CI₅₀ que es menor de aproximadamente 8%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% de la CI₅₀ de un antagonista del receptor de IL-1 β en un ensayo de inhibición de IL-1 β en sangre completa humana que mide la producción de IL-8 inducida con IL-1 β . En una realización, el antagonista del receptor de IL-1 β es anakinra (es decir, Kineret[®]).

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para tratar la artritis reumatoide en un individuo, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-IL-1 β o de un fragmento del mismo al individuo, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo proporciona una inhibición *in vivo* de la liberación de IL-6 estimulada con IL-1 β en ratones, en comparación con un anticuerpo testigo empleando un ensayo que está descrito por Economides et al., *Nature Med.*, 9:47-52 (2003) que se incorpora como referencia. En una realización, el anticuerpo o el fragmento proporciona una inhibición *in vivo* de la liberación de IL-6 estimulada con IL-1 β en ratones, de al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50% en comparación con el anticuerpo testigo. En una realización adicional, el anticuerpo o el fragmento proporciona una inhibición *in vivo* de la liberación de IL-6 estimulada con IL-1 β en ratones, de al menos aproximadamente 60%, 70%, 80%, 90%, 95% en comparación con el anticuerpo testigo. En una realización, el anticuerpo testigo es un anticuerpo testigo de isotipo.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para tratar la artritis reumatoide en un individuo, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-IL-1 β o de un fragmento del mismo al individuo, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo inhibe la producción de citocinas inducida con *Staphylococcus epidermidis* en sangre completa humana, en comparación con un testigo en el que no se utiliza anticuerpo. En una realización, el anticuerpo o el fragmento proporciona un mayor nivel de inhibición de la producción de citocinas inducida con *Staphylococcus epidermidis* en sangre completa humana, en al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, en comparación con el testigo. En una realización adicional, el anticuerpo o el fragmento proporciona un mayor nivel de inhibición de la producción de citocinas inducida con *Staphylococcus epidermidis* en sangre completa humana en al menos aproximadamente 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, en comparación con el testigo. En una realización, las citocinas inhibidas son IL-1 β , IL-1a, IL-6, IL-8, IL-1Ra, TNF α o IFN γ .

En otro aspecto, la descripción describe el uso de un anticuerpo anti-IL-1 β o de un fragmento del mismo que tiene una CI₅₀ menor que un antagonista del receptor de IL-1 β en un ensayo de inhibición de IL-1 β en sangre completa humana que mide producción de IL-8 inducida con IL-1 β , en la preparación de una composición para uso en el tratamiento de la artritis reumatoide. En una realización, el antagonista del receptor de IL-1 β es anakinra (es decir, Kineret[®]).

En otro aspecto de la descripción, el uso de anticuerpos o de fragmentos que se unen a de IL-1 β se contempla en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad o una afección tal y como se describe en esta memoria. En cualquiera de los usos, el medicamento puede estar coordinado con un tratamiento que emplea un segundo agente activo. En otra realización de la descripción, se contempla el uso de una combinación sinérgica de un anticuerpo de la presente descripción para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que presenta síntomas de riesgo de desarrollo de una enfermedad o una afección tal y como se describe en esta memoria, en donde el medicamento está coordinado con un tratamiento que emplea un segundo agente activo. Se contemplan las realizaciones de cualquiera de los usos mencionados anteriormente, en donde la cantidad de anticuerpo o de fragmento que se une a IL-1 β en el medicamento, se encuentra en una dosis efectiva para reducir la dosificación del segundo agente activo requerido para lograr un efecto terapéutico.

En otro aspecto más de la descripción, se proporciona un artículo fabricado, que comprende un recipiente, una composición dentro del recipiente que comprende un anticuerpo anti-IL-1 β o un fragmento del mismo, y un prospecto que contiene instrucciones para administrar el anticuerpo o el fragmento a un ser humano que requiera un tratamiento de acuerdo con los métodos mencionados anteriormente de la descripción. En una realización, el recipiente comprende además un vehículo, un excipiente o un diluyente farmacéuticamente adecuado. En una realización relacionada, la composición dentro del recipiente comprende además un segundo agente activo.

Los kits también se contemplan en la presente descripción. En una realización, un kit comprende una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento anti-IL-1 β , envasado en un recipiente, tal como un vial o una botella, y que comprende además una etiqueta fijada o empaquetada con el envase, en donde la etiqueta describe el contenido del envase y proporciona indicaciones y/o instrucciones relacionadas con la utilización de los contenidos del recipiente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o una afección de acuerdo con los métodos de la descripción mencionados anteriormente. En una realización, el recipiente comprende además un vehículo, un excipiente o un diluyente farmacéuticamente adecuado. En una realización relacionada, el envase contiene además un segundo agente activo.

En una realización, el artículo fabricado, el kit o el medicamento es para el tratamiento o la prevención de la artritis reumatoide en un individuo. En otra realización, las instrucciones de un prospecto de un artículo de fabricación o la etiqueta de un kit, comprenden instrucciones para la administración del anticuerpo o del fragmento de acuerdo con

cualquiera de las cantidades de dosis, el número de administraciones posteriores y los intervalos de dosificación entre las administraciones mencionados anteriormente, así como cualquier combinación de números de cantidades de dosis de las administraciones posteriores, y los intervalos de dosificación entre las administraciones descritos en la presente memoria. En aún otra realización, el recipiente del kit o el artículo de fabricación es una jeringuilla precargada.

Se ha de entender que, cuando en la presente memoria descriptiva se mencionan métodos de tratamientos que emplean anticuerpos o fragmentos de los mismos, con ciertas propiedades (por ejemplo, valores de K_d o valores de CI_{50}), esto también significa que representan el uso de tales anticuerpos o fragmentos de los mismos en la fabricación de un medicamento para uso en estos métodos. Además, la descripción también incluye anticuerpos o fragmentos de los mismos que tienen estas propiedades, así como composiciones farmacéuticas que comprenden estos anticuerpos o fragmentos de los mismos, para uso en los métodos de tratamiento descritos en lo sucesivo.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento *in vitro* de inhibición de IL-1 β , con el anticuerpo denominado AB7 y con Kineret[®], que implica la producción de IL-8 inducida con IL-1.

La Fig. 2A es un gráfico que muestra los resultados de un experimento *in vivo* de la inhibición de IL-1 β con los anticuerpos denominados AB5 y AB7 que implica la liberación de IL-6 estimulada con IL-1.

La Fig. 2B es un gráfico que muestra los resultados de un experimento *in vivo* de la inhibición de IL-1 β con los anticuerpos denominados AB7 que implica la liberación de IL-6 estimulada con IL-1, y la comparación de la inhibición de IL-1 β de ser humano (panel A) frente a IL-1 β de ratón (panel B).

La Fig. 3 es un gráfico que muestra las concentraciones en suero después de la administración 0,1, 1 o 10 mg/kg de un anticuerpo anti-IL-1 β .

La Fig. 4 es un gráfico que se basa en los perfiles de concentración en plasma de un anticuerpo anti-IL-1 β después de cinco dosis mensuales de 0,1, 0,3, 1 o 3 mg/kg.

La Fig. 5 es una tabla que muestra la reducción de la producción de citocinas inducida con *Staphylococcus epidermidis* en sangre completa humana mediante el tratamiento con un anticuerpo anti-IL-1 β .

La Fig. 6 es un gráfico que muestra la farmacocinética de AB7 en seres humanos después de la administración de una dosis de 0,01 mg/kg de anticuerpo.

La Fig. 7A es un gráfico que muestra las concentraciones en suero tras la administración iv de 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 o 1,0 mg/kg de un anticuerpo anti-IL-1 β en individuos humanos.

La Fig. 7B es un gráfico que muestra las concentraciones en suero tras la administración sc de 0,03, 0,1 y 0,3 mg/kg de un anticuerpo anti-IL-1 β en individuos humanos.

La Fig. 8 es un gráfico que muestra el cambio de porcentaje promedio de CRP el día 28, después de la administración de 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 o 1,0 mg/kg de un anticuerpo anti-IL-1 β a individuos humanos.

La Fig. 9 es un gráfico que muestra la protección en ratones contra la artritis inducida con colágeno usando el anticuerpo XOMA 052.

La Fig. 10 es un gráfico que muestra la protección en ratones contra la artritis inducida con colágeno usando el anticuerpo XOMA 052.

La Fig.11A es un gráfico que muestra la protección en ratones contra la artritis inducida con colágeno después del inicio de la enfermedad, mediante el uso del anticuerpo XOMA 052.

La Fig.11B es un gráfico que muestra la protección de ratones contra la artritis inducida con colágeno después del inicio de la enfermedad, mediante el uso del anticuerpo XOMA 052.

La Fig. 12 es un gráfico que muestra que el anticuerpo XOMA 052 evita la patología ósea en un modelo de ratón de artritis inducida con colágeno.

La Fig. 13 son imágenes que muestran que el anticuerpo XOMA 052 evita la inflamación y la destrucción del cartílago y del hueso en un modelo de ratón de artritis inducida con colágeno.

Descripción detallada

IL-1 β es una citocina proinflamatoria secretada por una variedad de tipos de células diferentes, que incluyen monocitos y macrófagos. Cuando se libera como parte de una reacción inflamatoria, la IL-1 β produce una serie de efectos biológicos, mediados principalmente por la inducción de otros mediadores inflamatorios, tales como la corticotropina, el factor plaquetario-4, la prostaglandina E2 (PGE2), la IL-6 y la IL-8. La IL-1 β induce efectos

inflamatorios tanto locales como sistémicos a través de la activación del receptor de IL-1 que se encuentra en casi todos los tipos celulares.

La familia de citocinas de la interleucina-1 (IL-1) está implicada en varias enfermedades tales como la artritis reumatoide (AR), la osteoartritis, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa (CU), el choque séptico, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), el asma, la enfermedad de injerto contra hospedador, la aterosclerosis, la leucemia de linfocitos T adultos, el mieloma múltiple, la esclerosis múltiple, la apoplejía y la enfermedad de Alzheimer. Los miembros de la familia de IL-1 incluyen IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra. Aunque están relacionadas por su capacidad para unirse a receptores de IL-1 (IL-1R1, IL-1R2), cada una de estas citocinas se expresa por un gen distinto y tiene una secuencia de aminoácidos primaria distinta. Además, las actividades fisiológicas de estas citocinas se pueden distinguir entre sí.

Los compuestos que interrumpen la señalización del receptor de IL-1 se han investigado como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades mediadas con IL-1, tales como, por ejemplo, algunas de las enfermedades mencionadas anteriormente. Estos compuestos incluyen IL-1Ra recombinante (Amgen Inc., Thousand Oaks, CA), péptido "trap" del receptor de IL-1 (Regeneron Inc., Tarrytown, NY), así como anticuerpos de IL-1 β derivados de animales y anticuerpos de IL-1 β recombinantes y fragmentos de los mismos.

Tal y como se ha señalado anteriormente, se ha empleado el polipéptido antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) en el tratamiento de la artritis reumatoide (RA), pero sigue existiendo una necesidad de medios más eficaces para tratar la AR, en particular aquellos que no requieren inyecciones repetidas frecuentemente (por ejemplo, diariamente). Un desafío adicional para los agentes terapéuticos basados en antagonistas del receptor de IL-1, es la necesidad de que tales agentes terapéuticos ocupen un gran número de receptores, lo que es una tarea formidable, ya que estos receptores se expresan ampliamente en todas las células, excepto los glóbulos rojos (Dinarelli, *Curr. Opin. Pharmacol.* 4:378-385, 2004). En la mayoría de las enfermedades mediadas por el sistema inmune, la cantidad de citocina IL-1 β que se puede medir en los fluidos corporales o que está asociada con células activadas, es relativamente baja. Por lo tanto, un método para tratar y/o prevenir que se dirige directamente a la diana del ligando de IL-1 β , es una estrategia preferente, particularmente cuando se administra un anticuerpo de IL-1 β de alta afinidad.

La presente descripción proporciona métodos y composiciones relacionadas y artículos de fabricación para el tratamiento y/o la prevención de la artritis reumatoide en un individuo (por ejemplo, mamífero, humano), utilizando un anticuerpo o un fragmento del mismo específico de IL-1 β . Tal y como se proporciona a continuación, los anticuerpos con alta afinidad pueden ser un inhibidor mucho más potente de la ruta de IL-1 que IL-Ra (por ejemplo, anakinra, Kineret[®]), y se utilizan para conseguir un efecto terapéutico con una dosis menor y/o con una administración menos frecuente de la que es necesaria con otros fármacos, como IL-1Ra recombinante.

Los métodos tales como los descritos en la presente memoria, con un anticuerpo o un fragmento de IL-1 β pueden incluir el tratamiento de un individuo que padece artritis reumatoide. Los métodos también pueden incluir la prevención de la aparición de AR en un individuo con riesgo de padecerla.

Anticuerpos, anticuerpos humanizados y anticuerpos humanos modificados genéticamente

Los anticuerpos que se unen a la IL-1 (por ejemplo, IL-1 β) o fragmentos de los mismos de la presente descripción pueden proporcionarse como anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (AcMs), anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos con CDR injertada, anticuerpos completamente humanos, anticuerpos de cadena sencilla y/o anticuerpos biespecíficos, así como fragmentos que incluyen variantes y derivados de los mismos, proporcionados por técnicas conocidas, que incluyen, pero no están limitadas a las mismas, la escisión enzimática, la síntesis de péptidos o técnicas recombinantes.

Los anticuerpos comprenden en general dos polipéptidos de cadena pesada y dos polipéptidos de cadena ligera, aunque también se contemplan los anticuerpos con un dominio único que tienen una cadena pesada y una cadena ligera, y los anticuerpos con cadena pesada desprovistos de cadenas ligeras. Hay cinco tipos de cadenas pesadas, llamadas alfa, delta, épsilon, gamma y mu, que se basan en la secuencia de aminoácidos del dominio constante de la cadena pesada. Estos diferentes tipos de cadenas pesadas dan lugar a cinco clases de anticuerpos, IgA (que incluye IgA₁ e IgA₂), IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, incluyendo cuatro subclases de IgG, a saber, IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. Hay también dos tipos de cadenas ligeras, denominadas kappa (κ) o lambda (λ) que se basan en la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes. Un anticuerpo de longitud completa incluye un dominio constante y un dominio variable. La región constante no necesita estar presente en un fragmento que se une a un antígeno de un anticuerpo. Los fragmentos que se unen a un antígeno de un anticuerpo descrito en la presente memoria pueden incluir fragmentos de anticuerpos Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v). Tal y como se describe con más detalle a continuación, los fragmentos que se unen a IL-1 β comprenden fragmentos de anticuerpos y polipéptidos que se unen a un antígeno que se unirá a IL-1 β .

Cada una de las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo, o los fragmentos de las mismas que se unen a un antígeno, incluye una región variable con tres regiones que determinan la complementariedad (CDRs) así como regiones estructurales que no son CDR (FRs). Las expresiones "cadena

pesada" y "cadena ligera", tal y como se emplean en esta memoria, significan la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera, respectivamente, a menos que se indique lo contrario. Las CDRs de la cadena pesada se denominan en esta memoria CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3. Las CDRs de la cadena ligera se denominan en esta memoria CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3. Las regiones variables y las CDRs en una secuencia de anticuerpo se pueden identificar (i) según las normas generales que se han desarrollado en la técnica, o (ii) alineando las secuencias frente a una base de datos de regiones variables conocidas. Los métodos para identificar estas regiones están descritos en Kontermann y Dubel, compiladores, *Antibody Engineering*, Springer, Nueva York, NY, 2001, y Dinarello et al., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley and Sons Inc., Hoboken, NJ, 2000. Las bases de datos de secuencias de anticuerpos se describen y se puede acceder a las mismas a través de la base de datos "The Kabatman" en www.bioinf.org.uk/abs (mantenida por A.C. Martin en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la "University College of London", Londres, Inglaterra) y VBASE2 en www.vbase2.org, tal y como se describe en Retter et al., *Nucl. Acids Res.*, 33 (edición de base de datos): D671-D674 (2005). El portal de la base de datos "Kabatman" también incluye normas generales para la identificación de CDRs. El término "CDR", tal y como se emplea en esta memoria, es como se define en Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*, 5ª ed., Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., 1991, a menos que se indique lo contrario.

Los anticuerpos policlonales se adquieren preferiblemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno seleccionado y un adyuvante. Una respuesta mejorada de los anticuerpos se puede obtener mediante la conjugación del antígeno seleccionado con una proteína que es inmunogénica en las especies que se van a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, seroalbúmina, tiroglobulina bovina o inhibidor de la tripsina de soja, utilizando un agente bifuncional o de derivación, por ejemplo, éster de maleimidobenzol sulfosuccinimida (conjugación a través de los residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de los residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico u otros agentes conocidos en la técnica.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, los conjugados inmunogénicos o los derivados mediante combinación de, por ejemplo, 100 µg o 5 µg de la proteína o del conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes más tarde, los animales se estimulan con 1/5 hasta 1/10 de la cantidad original de péptido o de conjugado en adyuvante completo de Freund, mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. A los 7-14 días después de la inyección estimuladora, se recoge sangre de los animales y se analiza el suero para estudiar el título de anticuerpos. Los animales se estimulan hasta que el título se estabiliza. Preferiblemente, el animal se estimula con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también se pueden preparar con un cultivo de células recombinantes como fusiones proteicas. Los agentes de agregación, tales como alumbre, también se usan adecuadamente para mejorar la respuesta inmune.

Anticuerpo monoclonal se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos. Los anticuerpos monoclonales son generalmente muy específicos, y se puede dirigir contra un único sitio antigénico, en contraste con preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos). Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se sintetizan mediante el cultivo homogéneo y no contaminado con otras inmunoglobulinas, con diferentes especificidades y características.

Los anticuerpos monoclonales que se van a utilizar de acuerdo con la presente descripción, se pueden preparar mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., (*Nature*, 256:495-7, 1975), o se pueden preparar mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, el documento de patente de EE.UU. nº 4.816.567). Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar a partir de bibliotecas de anticuerpos en fagos, usando las técnicas descritas, por ejemplo, por Clackson et al., (*Nature* 352:624-628, 1991) y Marks et al., (*J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991).

En el método del hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster o un mono macaco, se inmuniza tal y como se describe en este documento para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. A continuación, los linfocitos se fusionan con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", págs. 59 a 103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma así preparadas se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o varias sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que impiden el crecimiento de células que carecen de HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, mantienen una producción con un alto nivel estable de anticuerpos a través de las células productoras del anticuerpo seleccionado, y son sensibles a un medio. Las líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al.,

« Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications », págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)). Ejemplos de líneas de mieloma de múrido incluyen las obtenidas a partir de tumores de ratón MOP-21 y M.C.-11, disponibles en el Centro de Distribución de Células del "Salk Institute", San Diego, California, EE.UU., y células SP-2 o X63-Ag8-653, disponibles en la "American Type Culture Collection", Rockville, Md. EE.UU.

- 5 El medio de cultivo en el que están creciendo las células de hibridoma, se somete a ensayo para estudiar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de la unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de ligación *in vitro*, como el radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo inmunoenzimático (ELISA). La afinidad por la unión del anticuerpo monoclonal, por ejemplo, se puede determinar mediante el análisis de Scatchard (Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)).

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos con la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y pueden crecer mediante procedimientos convencionales (Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, DMEM o medio RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* como tumores de ascitis en un animal. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, del fluido de ascitis o del suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

- 20 Se contempla además que los anticuerpos de la descripción se pueden utilizar como fragmentos más pequeños del anticuerpo que se unen al antígeno, bien conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria.

La presente descripción incluye anticuerpos que se unen a IL-1 (por ejemplo, IL-1 β) que contienen dos cadenas pesadas de longitud completa y dos cadenas ligeras de longitud completa. Alternativamente, los anticuerpos que se unen a IL-1 β pueden ser estructuras artificiales tales como anticuerpos de cadena sencilla o "mini" anticuerpos que conservan la actividad de unión a IL-1 β . Tales estructuras artificiales se pueden preparar por métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, la clonación mediada por PCR y el ensamblaje de anticuerpos de cadena sencilla para expresión en *E. coli* (tal y como se describe en "Antibody Engineering, The practical approach series", J. McCafferty, H. R. Hoogenboom y D. J. Chiswell, editores, Oxford University Press, 1996). En este tipo de estructura artificial, las porciones variables de las cadenas pesada y ligera de una molécula de anticuerpo se amplifican mediante PCR a partir del ADNc. Los amplicones resultantes se ensamblan a continuación, por ejemplo, en una segunda etapa de PCR, a través de un ADN enlazador que codifica un enlazador proteico flexible compuesto por los aminoácidos Ser y Gly. Este enlazador permite que las porciones variables de las cadenas pesada y ligera se plieguen de tal manera que se regenere el bolsillo de unión al antígeno y el antígeno se una con afinidades frecuentemente comparables a las de las moléculas de inmunoglobulina dimerica parental de longitud completa.

35 Los anticuerpos y los fragmentos que se unen a IL-1 (por ejemplo, IL-1 β) de la presente descripción incluyen variantes de los anticuerpos ejemplares, los fragmentos y las secuencias descritas en este documento. Las variantes incluyen péptidos y polipéptidos que comprenden una o varias sustituciones, deleciones y/o adiciones de secuencias de aminoácidos, que tienen la misma afinidad y especificidad para unirse al epítipo o sustancialmente la misma, que uno o varios de los anticuerpos ejemplares, los fragmentos y las secuencias descritas en esta memoria. Así, las variantes incluyen péptidos y polipéptidos que comprenden una o varias sustituciones, deleciones y/o adiciones de secuencias de aminoácidos, en los anticuerpos ejemplares, los fragmentos y las secuencias descritas en esta memoria, en donde tales sustituciones, deleciones y/o adiciones no causan cambios sustanciales en la afinidad y la especificidad de la unión al epítipo. Por ejemplo, una variante de un anticuerpo o de un fragmento puede ser el resultado de uno o varios cambios de un anticuerpo o un fragmento, en donde el anticuerpo o el fragmento modificado tiene la misma o sustancialmente la misma afinidad y especificidad para unirse al epítipo que la secuencia de partida. Las variantes pueden ser de origen natural, tales como variantes alélicas o variantes por corte y empalme, o se pueden construir artificialmente. Las variantes pueden prepararse a partir de moléculas de ácido nucleico correspondientes que codifican dichas variantes. Las variantes de los presentes anticuerpos y fragmentos que se unen a IL-1 β pueden tener cambios en las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y/o pesada que se producen naturalmente o se introducen mediante modificación genética *in vitro* de secuencias naturales utilizando técnicas de ADN recombinante. Las variantes naturales incluyen las variantes "somáticas" que se generan *in vivo* en las secuencias de nucleótidos correspondientes de la línea germinal durante la generación de una respuesta con anticuerpos frente a un antígeno extraño.

55 Las variantes de anticuerpos y de fragmentos que se unen a IL-1 (por ejemplo, IL-1 β), también se pueden preparar mediante técnicas de mutagénesis. Por ejemplo, los cambios de aminoácidos se pueden introducir al azar a lo largo de una región codificadora del anticuerpo y las variantes resultantes pueden cribarse mediante afinidad por la unión a IL-1 β o mediante otra propiedad. Alternativamente, los cambios de aminoácidos pueden introducirse en regiones seleccionadas de un anticuerpo de IL-1 β , tales como CDRs de la cadena ligera y/o pesada, y/o en las regiones estructurales, y los anticuerpos resultantes pueden seleccionarse por la unión a IL-1 β o alguna otra actividad. Los cambios de aminoácidos incluyen una o varias sustituciones de aminoácidos en una CDR, que van desde una diferencia de un solo aminoácido a la introducción de múltiples permutaciones de aminoácidos dentro de una CDR

dada, tal como CDR3. En otro método, la contribución de cada residuo dentro de una CDR a la unión a IL-1 β , se puede determinar mediante la sustitución de al menos un residuo dentro de la CDR por alanina. Lewis et al. (1995), *Mol. Immunol.* 32: 1065-72. Los residuos que no sean óptimos para la unión a IL-1 β , se pueden cambiar posteriormente con el fin de determinar una secuencia más óptima. También se incluyen variantes generadas mediante la inserción de aminoácidos para aumentar el tamaño de una CDR, tal como CDR3. Por ejemplo, la mayor parte de las secuencias de CDR3 de la cadena ligera tienen nueve aminoácidos de longitud. Las secuencias de la cadena ligera en un anticuerpo que son menores de nueve residuos, se pueden mejorar para unirse a IL-1 β mediante la inserción de aminoácidos apropiados para aumentar la longitud de la CDR.

Las variantes también se pueden preparar por "intercambio al azar de cadenas" ligeras o pesadas. Marks et al. (1992), *Biotechnology* 10: 779-83. Una cadena ligera (o pesada) aislada se puede combinar con una biblioteca que tiene un repertorio de cadenas pesadas (o ligeras) y la población resultante se escruta en busca de una actividad deseada, tal como la unión a IL-1 β . Esto permite el escrutinio de una muestra mayor de diferentes cadenas pesadas (o ligeras) en combinación con una sola cadena ligera (o pesada), que la que es posible con bibliotecas que comprenden repertorios de cadenas tanto pesadas como ligeras.

Los anticuerpos y los fragmentos que se unen a IL-1 (por ejemplo, IL-1 β) de la presente descripción incluyen derivados de los anticuerpos, fragmentos y secuencias ejemplares descritas en esta memoria. Los derivados incluyen polipéptidos o péptidos, o variantes, fragmentos o derivados de los mismos, que se han modificado químicamente. Los ejemplos incluyen la fijación covalente de uno o varios polímeros, tales como polímeros solubles en agua o carbohidratos unidos a N o unidos a O, azúcares, fosfatos y/o otras moléculas semejantes. Los derivados se modifican de una manera que es diferente de los péptidos o polipéptidos de origen natural o de partida, ya sea en el tipo o la posición de las moléculas fijadas. Otros derivados incluyen la delección de uno o varios grupos químicos que se encuentran presentes naturalmente en el péptido o el polipéptido.

Los anticuerpos y los fragmentos que se unen a IL-1 β de la presente descripción pueden ser biespecíficos. Los anticuerpos o fragmentos biespecíficos pueden tener varias configuraciones. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden parecerse a anticuerpos individuales (o fragmentos de anticuerpos), pero tienen dos sitios diferentes de unión al antígeno (regiones variables). Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir por técnicas químicas (Kranz et al. (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78: 5807), mediante técnicas de "polydoma" (documento de patente de EE.UU. n° 4.474.893) o por técnicas de ADN recombinante. Los anticuerpos biespecíficos de la presente descripción pueden tener especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes, siendo al menos uno de ellos un epítipo de IL-1 β . Los anticuerpos y los fragmentos que se unen a IL-1 β también pueden ser heteroanticuerpos. Los heteroanticuerpos son dos o más anticuerpos, o fragmentos que se unen a anticuerpos (Fab) enlazados entre sí, teniendo cada anticuerpo o fragmento una especificidad diferente.

Las técnicas para crear versiones de ADN recombinante de las regiones que se unen al antígeno de moléculas de anticuerpos que evitan la generación de anticuerpos monoclonales, se contemplan para los presentes anticuerpos y fragmentos que se unen a IL-1 (por ejemplo, IL-1 β). El ADN se clona en un sistema de expresión bacteriano. Un ejemplo de tal técnica adecuada para la puesta en práctica de esta descripción, usa un sistema de vector bacteriófago lambda que tiene una secuencia líder que causa que la proteína Fab expresada migre al espacio periplásmico (entre la membrana celular bacteriana y la pared celular) o se secrete. Se puede generar y escrutar rápidamente un gran número de fragmentos Fab funcionales en busca de los que se unen a IL-1 β . Tales agentes que se unen a IL-1 β (fragmentos Fab con especificidad para un polipéptido de IL-1 β) están incluidos específicamente dentro de los anticuerpos y los fragmentos que se unen a IL-1 β de la presente descripción.

Los presentes anticuerpos y fragmentos que se unen a IL-1 (por ejemplo, IL-1 β) pueden ser anticuerpos humanizados o humanos modificados genéticamente. Tal y como se usa en este documento, un anticuerpo humanizado, o un fragmento del mismo que se une a antígeno, es un polipéptido recombinante que comprende una porción de un sitio que se une al antígeno procedente de un anticuerpo no humano y una porción de las regiones estructurales y/o constantes de un anticuerpo humano. Un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo humano modificado genéticamente es un anticuerpo no humano (por ejemplo, de ratón) en el que los aminoácidos se han modificado genéticamente (por ejemplo, mediante eliminación, inserción o sustitución) en posiciones específicas con el fin de reducir o eliminar cualquier inmunogenicidad detectable del anticuerpo modificado en un ser humano.

Los anticuerpos humanizados incluyen anticuerpos quiméricos y anticuerpos con CDRs injertadas. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos que incluyen una región variable del anticuerpo no humano, ligada a una región constante humana. Así, en los anticuerpos quiméricos, la región variable es en su mayoría no humana, y la región constante es humana. Los anticuerpos quiméricos y los métodos para su preparación se describen en Morrison, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81: 6841-6855 (1984), Boulianne, et al., *Nature*, 312: 643-646 (1984), y el documento de publicación de solicitud PCT WO 86/01533. Aunque, pueden ser menos inmunogénicas que un anticuerpo monoclonal de ratón, las administraciones de anticuerpos quiméricos se han asociado con respuestas de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) a la porción no humana de los anticuerpos. Los anticuerpos quiméricos también se pueden producir por corte y empalme de genes procedentes de una molécula de anticuerpo de ratón con una especificidad apropiada para unirse al antígeno, junto con genes de una molécula de anticuerpo humano con una actividad biológica apropiada, tal como la capacidad de activar el complemento humano y mediar en ADCC. Morrison et al. (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81: 6851; Neuberger et al. (1984), *Nature*, 312: 604. Un ejemplo es la

sustitución de una región Fc por la de un isotipo diferente.

Los anticuerpos con CDRs injertadas son anticuerpos que incluyen las CDRs de un anticuerpo no humano "donante", ligadas a la región estructural de un anticuerpo humano "receptor". Generalmente, los anticuerpos con CDRs injertadas incluyen más secuencias de anticuerpo humano que los anticuerpos quiméricos porque incluyen las secuencias (estructurales) tanto de la región constante como de la región variable procedentes de anticuerpos humanos. Por lo tanto, por ejemplo, un anticuerpo humanizado con CDRs injertadas de la descripción, puede comprender una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos contigua (por ejemplo, aproximadamente 5 o más, 10 o más, o incluso 15 o más residuos de aminoácidos contiguos) procedente de la región estructural de un anticuerpo humano (por ejemplo, FR-1, FR-2 o FR-3 de un anticuerpo humano) u, opcionalmente, la mayoría o la totalidad de la región estructural de un anticuerpo humano. Los anticuerpos con CDRs injertadas y los métodos para su preparación se describen en Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986), Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988) y Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988). Los métodos que se pueden utilizar para producir anticuerpos humanizados también están descritos en los documentos de patentes de EE.UU. 4.816.567, 5.721.367, 5.837.243 y 6.180.377. Los anticuerpos con CDRs injertadas se consideran menos propensos que los anticuerpos quiméricos a inducir una reacción inmune contra porciones de anticuerpos no humanos. Sin embargo, se ha informado de que secuencias estructurales procedentes de anticuerpos donantes son necesarias para la afinidad y/o la especificidad de la unión del anticuerpo donante, presumiblemente porque estas secuencias estructurales afectan al plegamiento de la porción que se une al antígeno del anticuerpo donante. Por lo tanto, cuando las secuencias de CDRs donantes no humanas se injertan en secuencias estructurales humanas inalteradas, el anticuerpo resultante con CDRs injertadas puede presentar, en algunos casos, una pérdida de la propensión a unirse, con respecto al anticuerpo donante original no humano. Véase, por ejemplo, Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988) y Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988).

Los anticuerpos humanos modificados genéticamente incluyen, por ejemplo anticuerpos "recubiertos" y anticuerpos preparados utilizando tecnología de Human Engineering® (véanse, por ejemplo, los documentos de patentes de EE.UU. 5.766.886 y 5.869.619). La tecnología de Human Engineering® está disponible comercialmente, y supone alterar un anticuerpo no humano o un fragmento de anticuerpo, tal como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de ratón o quimérico, haciendo cambios específicos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo, para producir un anticuerpo modificado con inmunogenicidad reducida en un ser humano que, no obstante, conserva las propiedades deseables de unión de los anticuerpos no humanos originales. En general, la técnica implica clasificar los residuos de aminoácidos de un anticuerpo no humano (por ejemplo, de ratón) como residuos de "bajo riesgo", "riesgo moderado" o de "alto riesgo". La clasificación se realiza mediante un cálculo global de riesgo/recompensa que evalúa los beneficios previstos por hacer una sustitución particular (por ejemplo, para la inmunogenicidad en humanos) frente al riesgo de que la sustitución afecte a las propiedades resultantes de plegamiento del anticuerpo y/o a las propiedades de unión al antígeno. Por lo tanto, una posición de bajo riesgo es una para la cual se prevé que una sustitución va a ser beneficiosa, ya que se predice que reducirá la inmunogenicidad sin afectar significativamente a las propiedades de unión al antígeno. Una posición de riesgo moderado es una para la que se prevé que una sustitución reducirá la inmunogenicidad, pero que es más probable que afecte al plegamiento de proteínas y/o a la unión al antígeno. Las posiciones de alto riesgo contienen residuos que estarán involucrados más probablemente en el plegamiento correcto o en la unión al antígeno. En general, las posiciones de bajo riesgo en un anticuerpo no humano están sustituidas con residuos humanos, las posiciones de alto riesgo están raramente sustituidas, y las sustituciones humanizantes en posiciones de riesgo moderado, a veces se hacen, aunque no indiscriminadamente. Las posiciones con prolinas en la secuencia de la región variable del anticuerpo no humano se clasifican generalmente como posiciones con riesgo al menos moderado.

El residuo de aminoácidos humano particular que se va a sustituir en una posición dada de bajo riesgo o riesgo moderado de una secuencia de anticuerpo no humano (por ejemplo, ratón), se puede seleccionar alineando una secuencia de aminoácidos procedente de las regiones variables del anticuerpo no humano con la región correspondiente de una secuencia de anticuerpo humano específica o de consenso. Los residuos de aminoácidos en posiciones con riesgo bajo o moderado en la secuencia no humana, se pueden sustituir por los residuos correspondientes en la secuencia de anticuerpo humano, de acuerdo con la alineación. Las técnicas para preparar proteínas humanas modificadas genéticamente se describen con mayor detalle en Studnicka et al., *Protein Engineering*, 7: 805-814 (1994), los documentos de patentes de EE.UU. 5.766.886, 5.770.196, 5.821.123 y 5.869.619, y el documento de publicación de solicitud PCT WO 93/11794.

Los anticuerpos "recubiertos" son anticuerpos no humanos o humanizados (por ejemplo, quiméricos o anticuerpos con CDRs injertadas) que han sido modificados genéticamente para reemplazar ciertos residuos de aminoácidos expuestos a disolvente, con el fin de reducir aún más su inmunogenicidad o mejorar su función. Como los residuos de la superficie de un anticuerpo quimérico, se presupone que probablemente afectarán menos al plegamiento apropiado del anticuerpo y más probablemente provoquen una reacción inmune, el recubrimiento de un anticuerpo quimérico puede incluir, por ejemplo, la identificación de residuos expuestos a disolvente en la región estructural no humana de un anticuerpo quimérico y sustituir al menos uno de ellos con los correspondientes residuos superficiales de una región estructural humana. El recubrimiento puede llevarse a cabo por cualquier técnica de ingeniería genética adecuada, incluyendo el uso de la tecnología anteriormente descrita, Human Engineering®.

En un enfoque diferente, una recuperación de la propensión a la unión se puede lograr "deshumanizando" un anticuerpo con CDRs injertadas. La deshumanización puede incluir la recuperación de residuos procedentes de las regiones estructurales del anticuerpo donante, en el anticuerpo con CDRs injertadas, recuperando de este modo el plegamiento apropiado. Una "deshumanización" similar se puede conseguir (i) incluyendo porciones de la región estructural del "donante" en el anticuerpo "receptor", o (ii) injertando porciones de la región estructural del anticuerpo "donante" en el anticuerpo receptor (junto con las CDRs injertadas del donante).

Para una descripción adicional de anticuerpos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos modificados genéticamente y los métodos para su preparación, véase Kontermann y Dubel, compiladores, *Antibody Engineering*, Springer, Nueva York, NY, 2001.

Ejemplos de anticuerpos humanizados o humanos modificados genéticamente incluyen anticuerpos IgG, IgM, IgE, IgA e IgD. Los anticuerpos presentes pueden ser de cualquier clase (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, etc.) o isotipos y pueden comprender una cadena ligera kappa o lambda. Por ejemplo, un anticuerpo humano puede comprender una cadena pesada de IgG o un fragmento definido, tal como al menos uno de los isotipos, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Como ejemplo adicional, los presentes anticuerpos o fragmentos pueden comprender una cadena pesada de IgG1 y una cadena ligera de IgG1.

Los presentes anticuerpos y fragmentos pueden ser anticuerpos humanos, tales como anticuerpos que se unen a polipéptidos de IL-1 β y están codificadas por secuencias de ácidos nucleicos que son variantes somáticas presentes en la naturaleza de una secuencia de ácido nucleico de inmunoglobulina de la línea germinal humana, y fragmentos, variantes sintéticas, derivados y fusiones de las mismas. Tales anticuerpos se pueden producir según cualquier método conocido en la técnica, tal como mediante el uso de mamíferos transgénicos (tales como ratones transgénicos) en los que el repertorio de inmunoglobulinas naturales se ha sustituido con genes V humanos en el cromosoma de mamífero. Tales mamíferos parecen realizar una recombinación VDJ e hipermutación somática de los genes de anticuerpos de la línea germinal humana de manera normal, produciendo así anticuerpos de alta afinidad con secuencias completamente humanas.

Los anticuerpos humanos para la proteína diana también se pueden producir usando animales transgénicos que no tienen una producción endógena de inmunoglobulinas y están diseñados para contener loci de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, el documento WO 98/24893 da a conocer animales transgénicos que tienen un locus de Ig humana en donde los animales no producen inmunoglobulinas endógenas funcionales debido a la inactivación de los loci endógenos de la cadena pesada y ligera. El documento WO 91/00906 describe también hospedadores transgénicos de mamífero no primate capaces de incrementar una respuesta inmune frente a un inmunógeno, en donde los anticuerpos tienen regiones constantes y/o variables de primate, y en donde los loci que codifican la inmunoglobulina endógena están sustituidos o inactivados. El documento WO 96/30498 y la patente de EE.UU. nº 6.091.001 describen el uso del sistema Cre/Lox para modificar el locus de inmunoglobulina en un mamífero, de tal que se reemplaza toda o una porción de la región constante o variable para formar una molécula de anticuerpo modificado. El documento WO 94/02602 da a conocer hospedadores de mamíferos no humanos que tienen loci endógenos de Ig inactivados y loci de Ig humana funcionales. El documento de patente de EE.UU. nº 5.939.598 describe métodos para preparar ratones transgénicos en los que los ratones carecen de cadenas pesadas endógenas, y expresan un locus de inmunoglobulina exógeno que comprende una o varias regiones constantes xenogénicas. Véanse también los documentos de patentes de EE.UU. nº 6.114.598 6.657.103 y 6.833.268.

Con el uso de un animal transgénico descrito anteriormente, se puede producir una respuesta inmune frente a una molécula antigénica seleccionada, y las células productoras de anticuerpos se pueden eliminar del animal e utilizar para producir hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos. Protocolos de inmunización, adyuvantes y similares son conocidos en la técnica, y se utilizan en la inmunización, por ejemplo, de un ratón transgénico, tal y como se describe en el documento WO 96/33735. Esta publicación describe anticuerpos monoclonales contra una variedad de moléculas antigénicas que incluyen IL-6, IL-8, TNF α , CD4 humana, selectina L, gp39 y toxina tetánica. Los anticuerpos monoclonales se pueden someter a ensayo para estudiar su capacidad de inhibir o neutralizar la actividad biológica o el efecto fisiológico de la proteína correspondiente. El documento WO 96/33735 describe que anticuerpos monoclonales contra IL-8, obtenidos a partir de células inmunes de ratones transgénicos inmunizados con IL-8, bloquean las funciones inducidas con IL-8 de los neutrófilos. Los anticuerpos monoclonales humanos con especificidad hacia el antígeno usado para inmunizar animales transgénicos, también se describen en el documento WO 96/34096 y la solicitud de patente de EE.UU. nº 20030194404; y la solicitud de patente de EE.UU. nº 20030031667.

Los animales transgénicos adicionales útiles para producir anticuerpos monoclonales incluyen el ratón Medarex HuMAb-Mouse[®], descrito en el documento de patente de EE.UU. nº 5.770.429 y Fishwild, et al. (*Nat. Biotechnol.* 14:845-851, 1996), el cual contiene secuencias génicas de genes de anticuerpo humano no reordenados que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos humanos. La inmunización de un HuMAb-Mouse[®], permite la producción de anticuerpos monoclonales totalmente humanos para la proteína diana.

Además, Ishida et al. (*Cloning Stem Cells* 4:91-102, 2002) describen el ratón TransChromo (TCMOUSE[®]), que comprende segmentos con tamaño de megabase de ADN humano y que incorpora todos los loci de la inmunoglobulina humana (hlg). El TCMOUSE[®] cuenta con un repertorio totalmente diverso de hlg, incluyendo todas

las subclases de IgGs (IgG1-G4). La inmunización del ratón TCMOUSE[®] con diversos antígenos humanos produce respuestas de anticuerpos que comprenden anticuerpos humanos.

Véase también Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immunol.*, 7:33 (1993); y los documentos de patentes estadounidenses nº 5.591.669, 5.589.369, 5.545.807, y la publicación de patente estadounidense 20020199213. El documento de publicación de patente de EE.UU. 20030092125 describe métodos para la polarización de la respuesta inmune de un animal hacia el epítipo deseado. Los anticuerpos humanos también se pueden generar mediante linfocitos B activados *in vitro* (véanse los documentos de patente de EE.UU. nº 5.567.610 y 5.229.275).

Los anticuerpos humanos también se pueden generar a través de una selección *in vitro* de bibliotecas de presentación de anticuerpos. Véase Hoogenboom et al. (1991), *J. Mol. Biol.* 227: 381; y Marks et al. (1991), *J. Mol. Biol.* 222: 581. Se han descrito diversas bibliotecas de presentación de fagos que contienen anticuerpos y se pueden preparar fácilmente. Las bibliotecas pueden contener una diversidad de secuencias de anticuerpos humanos, tales como fragmentos Fab, Fv y scFv humanos, que se pueden seleccionar contra una diana apropiada. Las bibliotecas de presentación de fagos pueden comprender péptidos o proteínas que no sean anticuerpos, que se pueden escrutar para identificar agentes de unión selectivos que se unen a IL-1 β .

El desarrollo de tecnologías para la preparación de repertorios de genes de anticuerpos humanos recombinantes, y la visualización de los fragmentos de anticuerpo codificados en la superficie de un bacteriófago filamentoso, ha proporcionado un medio para preparar directamente anticuerpos humanos. Los anticuerpos producidos por la tecnología de fagos se producen como fragmentos que se unen al antígeno, generalmente fragmentos Fv o Fab, en bacterias y, por lo tanto, carecen de funciones efectoras. Las funciones efectoras se pueden introducir mediante una de dos estrategias: Los fragmentos se pueden modificar genéticamente ya sea en forma de anticuerpos completos para la expresión en células de mamífero, o en forma de fragmentos de anticuerpos biespecíficos con un segundo sitio de unión capaz de desencadenar una función efectora.

La descripción contempla un método para producir un anticuerpo específico de una diana o una porción del mismo que se une al antígeno que comprende las etapas de sintetizar una biblioteca de anticuerpos humanos sobre fagos, escrutar la biblioteca con la proteína diana o una porción de la misma, aislar los fagos que se unen a la diana y obtener el anticuerpo a partir del fago. A modo de ejemplo, un método para la preparación de la biblioteca de anticuerpos para su uso en técnicas de presentación sobre fagos, comprende las etapas de inmunizar un animal no humano que comprende loci de inmunoglobulina humana con el antígeno diana o una parte antigénica del mismo para crear una respuesta inmune, extraer las células productoras de anticuerpos del animal inmunizado; aislar el ARN a partir de las células extraídas, transcribir de forma inversa el ARN para producir ADNc, amplificar el ADNc usando un cebador e insertar el ADNc en un vector de presentación en fagos de modo que los anticuerpos se expresen en el fago. Los anticuerpos recombinantes específicos de la diana de la descripción, se pueden obtener de esta manera.

Los procesos de presentación sobre fagos imitan la selección inmune a través de la presentación de repertorios de anticuerpos en la superficie de un bacteriófago filamentoso, y la selección posterior del fago por su unión a un antígeno seleccionado. Una técnica tal se describe en el documento WO 99/10494, que describe el aislamiento de anticuerpos de alta afinidad y anticuerpos agonistas funcionales para receptores MPL y msk, usando dicho enfoque. Los anticuerpos de la descripción pueden aislarse mediante el escrutinio de una biblioteca combinatoria de anticuerpos recombinantes, preferiblemente una biblioteca de presentación en fagos de scFv, preparada usando ADNc humano de V_L y V_H preparado a partir de ARNm obtenido de linfocitos humanos. Las metodologías para la preparación y el escrutinio de tales bibliotecas se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, el documento de patente de EE.UU. nº 5.969.108. Existen kits disponibles en el mercado para generar bibliotecas de presentación en fagos (por ejemplo, el sistema de anticuerpos recombinantes en fagos de Pharmacia, nº de catálogo 27-9400-01; y el kit de presentación en fagos SurfZAP.TM de Stratagene, nº de catálogo 240612). Hay también otros métodos y reactivos que se pueden utilizar en la generación y la selección de bibliotecas de presentación de anticuerpos (véase, por ejemplo, Ladner et al., documento de patente de EE.UU. nº 5.223.409; Kang et al., documento de publicación PCT nº WO 92/18619; Dower et al., documento de publicación PCT nº WO 91/17271; Winter et al., documento de publicación PCT nº WO 92/20791; Markland et al., documento de publicación PCT nº WO 92/15679; Breitling et al., documento de publicación PCT nº WO 93/01288; McCafferty et al., documento de publicación PCT nº WO 92/01047; Garrard et al., documento de publicación PCT nº WO 92/09690; Fuchs et al., (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay et al. (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse et al. (1989) *Science* 246:1275-1281; McCafferty et al., *Nature* (1990) 348:552-554; Griffiths et al. (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628; Gram et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:3576-3580; Garrard et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; y Barbas et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:7978-7982.

En una realización, para aislar anticuerpos humanos específicos del antígeno diana con las características deseadas, se escrutó una biblioteca de V_H y V_L humanas para seleccionar los fragmentos de anticuerpos que tenían la especificidad deseada. Las bibliotecas de anticuerpos utilizadas en este método son preferiblemente bibliotecas de scFv preparadas y escrutadas tal y como se describe en la presente memoria y en la técnica (McCafferty et al., documento de publicación PCT nº WO 92/01047, McCafferty et al., (*Nature* 348:552-554, 1990) y Griffiths et al.,

(*EMBO J* 12:725-734, 1993). Las bibliotecas de anticuerpos scFv se escrutan preferentemente usando la proteína diana como el antígeno.

Alternativamente, el fragmento Fd (V_H - C_H1) y la cadena ligera (V_L - C_L) de los anticuerpos se clonan por separado mediante PCR y se recombinan aleatoriamente en bibliotecas combinatorias de presentación en fagos, que a continuación se pueden seleccionar por la unión a un antígeno particular. Los fragmentos Fab se expresan en la superficie del fago, es decir, están ligados físicamente a los genes que los codifican. Por tanto, con la selección de Fab mediante la unión al antígeno, se seleccionan conjuntamente las secuencias que codifican Fab, que pueden amplificarse posteriormente. A través de varias rondas de unión a antígeno y reamplificación, un procedimiento denominado "panning" o selección, Fab específicos del antígeno se enriquecen y finalmente se aíslan.

En 1994, se describió una propuesta para la humanización de anticuerpos, llamada "selección guiada". La selección guiada utiliza el poder de la técnica de presentación en fagos para la humanización de un anticuerpo monoclonal de ratón (véase Jaspers, L. S., et al., *Bio/Technology* 12, 899-903 (1994)). Para ello, el fragmento Fd del anticuerpo monoclonal de ratón se puede visualizar en combinación con una biblioteca de cadenas ligeras humanas, y la biblioteca resultante de Fab híbridos se puede seleccionar a continuación con un antígeno. El fragmento Fd de ratón proporciona por lo tanto un molde para guiar la selección. Posteriormente, las cadenas ligeras humanas seleccionadas se combinan con una biblioteca de fragmentos Fd humanos. La selección de la biblioteca resultante proporciona un Fab completamente humano.

Se ha descrito una variedad de procedimientos para obtener anticuerpos humanos a partir de bibliotecas de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); documentos de patentes estadounidenses 5.565.332 y 5.573.905; Clackson, T. y Wells, J. A., *TIBTECH* 12, 173-184 (1994)). En particular, la selección *in vitro* y la evolución de los anticuerpos obtenidos a partir de bibliotecas de presentación en fagos, se ha convertido en una herramienta poderosa (véase Burton, D. R., y Barbas III, C. F., *Adv. Immunol.* 57, 191-280 (1994); Winter, G., et al., *Annu. Rev. Immunol.* 12, 433-455 (1994); documentos de publicación patente de EE.UU. n° 20020004215 y WO 92/01047; documento de publicación de patente de EE.UU. 20030190317 y documentos de patentes de EE.UU. n° 6.054.287 y 5.877.293.

Watkins, "Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries by Capture Lift" *Methods in Molecular Biology, Antibody Phage Display: Methods and Protocols* 178: 187-193 (2002) y el documento de publicación de patente EE.UU. n° 20030044772, publicado el 6 de marzo 2003, describen métodos para escrutar bibliotecas de anticuerpos expresados en fagos u otras moléculas que se unen por captura por levantamiento, un método que implica la inmovilización de las moléculas candidatas que de la unión sobre un soporte sólido.

Los fragmentos Fv se muestran en la superficie del fago, mediante la asociación de una cadena expresada como una proteína de fusión del fago (por ejemplo, con el gen III de M13), con la cadena complementaria expresada como un fragmento soluble. Se contempla que el fago puede ser un fago filamentosos tal como uno de los fagos de clase I: fd, M13, f1, If1, Ike, ZJ/Z, Ff y uno de los fagos de clase II Xf, Pf1 y Pf3. El fago puede ser M13 o fd o un derivado del mismo.

Una vez que se seleccionan los segmentos humanos iniciales de V_L y V_H , se realizan experimentos de "mezclar y combinar", en los que diferentes parejas de los segmentos de V_L y V_H seleccionados inicialmente son evaluados en tanto a su unión a la diana, para seleccionar combinaciones de parejas V_L y V_H preferidas. Además, para mejorar aún más la calidad del anticuerpo, los segmentos V_L y V_H de la(s) pareja(s) preferida(s) de V_L V_H , se pueden mutar al azar, preferiblemente dentro de cualquiera de las regiones CDR1, CDR2 o CDR3 de V_L y/o V_H , en un proceso análogo al proceso de mutación somática *in vivo*, responsable de la maduración por afinidad de anticuerpos durante una respuesta inmune natural. Esta maduración por afinidad *in vitro* se puede llevar a cabo mediante la amplificación de las regiones V_L y V_H utilizando cebadores de PCR complementarios a CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H , o a CDR1, CDR2 y CDR3 de V_L , respectivamente, cuyos cebadores han sido "fortalecidos" con una mezcla aleatoria de las cuatro bases nucleotídicas en ciertas posiciones, de modo que los productos resultantes de la PCR codifican segmentos V_L y V_H en los que se han introducido mutaciones aleatorias en las regiones CDR3 de V_L y V_H . Estos segmentos de V_L y V_H mutados al azar se pueden escrutar de nuevo por la unión a un antígeno diana.

Después de escrutar y aislar un anticuerpo diana específico a partir de una biblioteca de presentación de inmunoglobulinas recombinantes, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo seleccionado puede recuperarse a partir del empaquetamiento mostrado (por ejemplo, del genoma del fago) y subclonarse en otros vectores de expresión mediante técnicas convencionales de ADN recombinante. Si se desea, el ácido nucleico puede manipularse adicionalmente para crear otras formas de anticuerpos de la descripción, tal y como se describe a continuación. Para expresar un anticuerpo humano recombinante aislado mediante el escrutinio de una biblioteca combinatoria, el ADN que codifica el anticuerpo se clona en un vector de expresión recombinante y se introduce en una célula hospedadora de mamífero, tal y como se describe en la presente memoria.

Se contempla que el método de presentación en fagos se puede llevar a cabo en una cepa mutadora de bacterias o de células hospedadoras. Una cepa mutadora es una célula hospedadora que tiene un defecto genético que causa que el ADN replicado dentro de ella va a ser mutado con respecto a su ADN parental. Ejemplos de cepas mutadoras son NR9046mutD5 y NR9046 mut T1.

También se contempla que el método de presentación en fagos se puede llevar a cabo utilizando un fago auxiliar. Este es un fago que se utiliza para infectar células que contienen un genoma de fago defectuoso y que actúa para complementar el defecto. El genoma del fago defectuoso puede ser un fagémido o un fago con algunas secuencias génicas que codifican una función que han sido eliminadas. Ejemplos de fagos auxiliares son M13K07, gen III nº 3 de M13K07 y fagos que presentan o que codifican una molécula de unión, fusionada a una proteína de la cápsida.

Los anticuerpos también se generan a través de métodos de escrutinio de presentación en fagos usando el enfoque combinatorio dual jerárquico, tal y como se describe en el documento WO 92/01047, en el que se utiliza una colonia individual que contiene ya sea un clon de cadena H o L para infectar una biblioteca completa de clones que codifican la otra cadena (L o H) y el miembro resultante de la unión específica de dos cadenas se selecciona de acuerdo con las técnicas de presentación en fagos, tales como las descritas en esta memoria. Esta técnica también se describe en Marks et al., (*Bio/Technology*, 10:779-783, 1992).

Los métodos para la visualización de péptidos sobre la superficie de levadura y de células microbianas se han utilizado también para identificar anticuerpos específicos de antígeno. Véase, por ejemplo, el documento de patente de EE.UU. nº 6.699.658. Las bibliotecas de anticuerpos se pueden fijar a proteínas de levadura, tales como aglutinina, imitando de forma eficaz la presentación en la superficie celular de los anticuerpos mediante linfocitos B en el sistema inmune.

Además de los métodos de presentación en fagos, los anticuerpos se pueden aislar utilizando métodos de presentación de ARNm en ribosomas y métodos de presentación en células microbianas. La selección de polipéptidos mediante la presentación en ribosomas se describe en Hanes et al., (*Proc. Natl Acad Sci USA*, 94:4937-4942, 1997) y los documentos de patente de EE.UU. nº 5.643.768 y 5.658.754 expedida a Kawasaki. La presentación en ribosomas también es útil para un análisis mutacional rápido a gran escala de anticuerpos. El enfoque de la mutagénesis selectiva también proporciona un método para producir anticuerpos con actividades mejoradas que se pueden seleccionar utilizando técnicas de presentación en ribosomas.

Los anticuerpos y los fragmentos que se unen a IL-1 (por ejemplo, IL-1 β) pueden comprender una o varias porciones que no se unen a IL-1 β , sino que son responsables de otras funciones, como la semivida circulante, el efecto citotóxico directo, una marcación detectable o la activación de la cascada del complemento endógeno del receptor o la citotoxicidad celular endógena. Los anticuerpos o fragmentos pueden comprender la totalidad o una porción de la región constante y pueden tener de cualquier isotipo, incluyendo IgA (por ejemplo, IgA1 o IgA2), IgD, IgE, IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) o IgM. Además o en lugar de comprender una región constante, los compuestos que se unen al antígeno de la descripción pueden incluir un marcador del epítipo, un epítipo de receptor de recuperación, un residuo marcador para efectos diagnósticos o fines de purificación, o un residuo citotóxico tal como un radionúclido o una toxina.

La región constante (cuando esté presente) de los presentes anticuerpos y fragmentos puede ser de tipo γ 1, γ 2, γ 3, γ 4, μ , β 2 o δ o ϵ , preferiblemente del tipo γ , más preferiblemente de tipo γ , mientras que la parte constante de una cadena ligera humana puede ser del tipo κ o λ (que incluye los subtipos λ 1, λ 2 y λ 3) pero es preferiblemente del tipo κ .

Las variantes también incluyen anticuerpos o fragmentos que comprenden una región Fc modificada, en donde la región Fc modificada comprende al menos una modificación de aminoácidos con respecto a una región Fc de tipo silvestre. La región Fc variante puede estar diseñada, con respecto a una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre, de modo que se una a receptores de Fc con una mayor o menor afinidad.

Por ejemplo, los presentes anticuerpos y fragmentos que se unen a IL-1 β pueden comprender una región Fc modificada. La región Fc se refiere a polipéptidos de origen natural o sintético, homólogos al dominio C-terminal de IgG que se produce tras la digestión con papaína de IgG. Fc de IgG tiene un peso molecular de aproximadamente 50 kD. En los presentes anticuerpos y fragmentos, se puede utilizar toda una región Fc, o solo una porción que mejora la semivida. Además, son aceptables muchas modificaciones en la secuencia de aminoácidos, ya que la actividad natural no es necesaria o deseada en todos los casos.

La región Fc se puede mutar, si se desea, para inhibir su capacidad para fijar el complemento y la unión al receptor de Fc con alta afinidad. Para Fc de IgG de murino, la sustitución de los residuos de Ala por Glu 318, Lys 320 y Lys 322 hace que la proteína sea incapaz de dirigir la ADCC. La sustitución de Glu por Leu 235 inhibe la capacidad de la proteína para unirse al receptor de Fc con alta afinidad. Se conocen también varias mutaciones de la IgG humana (véase, por ejemplo, Morrison et al., 1994, *The Immunologist* 2: 119 124 y Brekke et al., 1994, *The Immunologist* 2: 125).

En algunas realizaciones, los presentes anticuerpos o fragmentos se proporcionan con una región Fc modificada en donde una región Fc de origen natural se modifica para aumentar la semivida del anticuerpo o del fragmento en un medio biológico, por ejemplo, la semivida en suero o la semivida medida por un ensayo *in vitro*. Los métodos para alterar la forma original de una región Fc de una IgG, también se describen en el documento de patente de EE.UU. nº 6.998.253.

En ciertas realizaciones, puede ser deseable modificar el anticuerpo o el fragmento a fin de incrementar su semivida

en suero, por ejemplo, añadiendo moléculas tales como PEG u otros polímeros solubles en agua, incluyendo polímeros polisacáridos, a fragmentos de anticuerpo para aumentar la semivida. Esto también se puede lograr, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítipo de recuperación que se une al receptor en el fragmento de anticuerpo (por ejemplo, mediante mutación de la región adecuada en el fragmento de anticuerpo o mediante la

5 incorporación del epítipo en un marcador peptídico que se fusiona a continuación con el fragmento de anticuerpo en cualquier extremo o en el medio, por ejemplo, mediante síntesis de ADN o de péptidos) (véase, el documento de publicación Internacional nº WO96/32478). El epítipo de recuperación que se une al receptor se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable de aumentar *in vivo* la semivida en suero de la molécula de IgG.

10 Un epítipo de recuperación que se une a un receptor puede incluir una región en la que uno o varios residuos de aminoácidos procedentes de uno o dos bucles de un dominio Fc, se transfieren a una posición análoga del fragmento de anticuerpo. Incluso más preferiblemente se transfieren tres o más residuos procedentes de uno o dos bucles del dominio Fc. Aún más preferido, el epítipo se obtiene a partir del dominio CH2 de la región Fc (por ejemplo, de una IgG) y se transfiere a la región CH1, CH3 o V_H, o a más de una de estas regiones, del anticuerpo.

15 Alternativamente, el epítipo se obtiene a partir del dominio CH2 de la región Fc y se transfiere a la región C_L o la región V_L, o a ambas, del fragmento de anticuerpo. Véanse también los documentos de solicitudes internacionales WO 97/34631 y WO 96/32478, que describen variantes de Fc y su interacción con el receptor de recuperación.

La mutación de los residuos dentro de los sitios que se unen al receptor de Fc puede dar lugar a una alteración de la función efectora, tal como una alteración de la actividad ADCC o CDC, o una semivida alterada. Posibles mutaciones incluyen inserción, delección o sustitución de uno o varios residuos, incluyendo la sustitución con alanina, una sustitución conservadora, una sustitución no conservadora o sustituir con un residuo de aminoácido correspondiente en la misma posición procedente de una subclase de IgG distinta (por ejemplo, sustitución de un residuo de IgG1 con un residuo de IgG2 correspondiente en esa posición). Por ejemplo se ha informado de que la mutación de la serina en la posición de aminoácido 241 en IgG4 por prolina (que se encuentra en esa posición en IgG1 e IgG2)

20 condujo a la producción de un anticuerpo homólogo, así como a una semivida en suero prolongada y a una mejora en la distribución en el tejido, en comparación con la IgG4 quimérica original. (Angal et al., *Mol. Immunol.* 30:105-8, 1993).

Los fragmentos de anticuerpos son porciones de un anticuerpo intacto de longitud completa, tal como una región que se une al antígeno o variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla (por ejemplo, scFv); fragmentos de anticuerpos multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos, triespecíficos y multiespecíficos (por ejemplo, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos); minicuerpos, anticuerpos recombinantes quelantes; triacuerpos o bicuerpos; intracuerpos; nanocuerpos; pequeños agentes inmunofarmacéuticos modulares (SMIP), adnectinas, proteínas de fusión de inmunoglobulina de domino de unión; anticuerpos de camélidos;

30 anticuerpos que contienen V_{HH}; y cualquier otro polipéptido formado a partir de fragmentos de anticuerpo.

La presente descripción incluye fragmentos de anticuerpo que se unen a IL-1β que comprenden cualquiera de las secuencias de la cadena pesada o ligera anteriores y que se unen a IL-1β. El término fragmentos tal y como se usa en esta memoria, se refiere a cualquiera de los 3 o más aminoácidos contiguos (por ejemplo, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 8 o más, o incluso 10 o más aminoácidos contiguos) del anticuerpo e incluye Fab, Fab', F(ab')₂, y fragmentos de F(v), o las regiones variables individuales de la cadena pesada o la cadena ligera, o parte de las mismas. Los fragmentos que se unen a IL-1β incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y scFv. Estos fragmentos carecen del fragmento Fc de un anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación y pueden tener menos unión no específica a tejido que un anticuerpo intacto. Véase Wahl et al., (1983), *J. Nucl. Med.*, 24: 316-25. Estos fragmentos se pueden producir a partir de anticuerpos intactos utilizando métodos bien conocidos, por ejemplo, mediante escisión proteolítica con enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂).

40

45

Ensayos *in vitro* y basados en células se describen ampliamente en la técnica para emplear en la determinación de la unión de IL-1β con un receptor de tipo I de IL-1 (IL-1RI), incluyendo ensayos que determinan la presencia de moléculas (tales como anticuerpos, antagonistas u otros inhibidores) que se unen a IL-1β o IL-1RI. (Véase, por ejemplo Evans et al., (1995), *J. Biol. Chem.* 270:11477-11483; Vigers et al., (2000), *J. Biol. Chem.* 275:36927-36933; Yanofsky et al., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:7381-7386; Fredericks et al., (2004), *Protein Eng. Des. Sel.* 17:95-106; Slack et al., (1993), *J. Biol. Chem.* 268:2513-2524; Smith et al., (2003), *Immunity* 18:87-96; Vigers et al., (1997), *Nature*, 386:190-194; Ruggiero et al., (1997), *J. Immunol.* 158:3881-3887; Guo et al., (1995), *J. Biol. Chem.* 270:27562-27568; Svenson et al., (1995), *Eur. J. Immunol.* 25:2842-2850; Arend et al., (1994), *J. Immunol.* 153:4766-4774). El receptor recombinante de tipo I de IL-1 que incluye el receptor humano de tipo I de IL-1, para tales ensayos se puede obtener fácilmente a partir de una variedad de fuentes comerciales (véase, por ejemplo R&D Systems, SIGMA). El receptor de tipo I de IL-1 también se puede expresar a partir de una estructura artificial o un vector de expresión introducido en una célula hospedadora apropiada, empleando técnicas convencionales de biología molecular y de transfección conocidas en la técnica. El receptor de tipo I de IL-1 expresado se puede aislar a continuación y purificar para su uso en ensayos de ligación o, alternativamente, utilizar directamente en una forma asociada a la célula.

50

55

60

Por ejemplo, la unión de IL-1 β al receptor de tipo I de IL-1 se puede determinar mediante la inmovilización de un anticuerpo que se une a IL-1 β , poniendo en contacto IL-1 β con el anticuerpo inmovilizado y determinando si IL-1 β se había unido al anticuerpo, y poniendo en contacto una forma soluble de IL-1RI con el complejo IL-1 β /anticuerpo unido y determinando si IL-1RI soluble se había unido al complejo. El protocolo también puede incluir poner en contacto IL-1RI soluble con el anticuerpo inmovilizado antes del contacto con IL-1 β , para confirmar que IL-1RI soluble no se une al anticuerpo inmovilizado. Este protocolo se puede realizar usando un instrumento de Biacore[®] para el análisis cinético de las interacciones de la unión. Dicho protocolo también se puede emplear para determinar si un anticuerpo u otra molécula permiten o bloquean la unión de IL-1 β con el receptor de tipo I de IL-1.

Por otros ensayos de la unión de IL-1 β /IL-1RI, permitir o bloquear la unión de IL-1 β con el receptor de tipo I de IL-1 se puede determinar mediante la comparación de la unión de IL-1 β con IL-1RI, en presencia o en ausencia de anticuerpos de IL-1 β o de fragmentos que se unen a IL-1 β de los mismos. El bloqueo se identifica en la lectura del ensayo como una reducción señalada de la unión de IL-1 β con el receptor de tipo I de IL-1, en presencia de anticuerpos anti-IL-1 β o fragmentos de los mismos que se unen a IL-1 β , en comparación con una muestra testigo que contiene el correspondiente tampón o diluyente pero no un anticuerpo de IL-1 β o un fragmento del mismo que se une a IL-1 β . La lectura del ensayo se puede valorar cualitativamente como que indica la presencia o ausencia de bloqueo, o se puede valorar cuantitativamente como que indica un porcentaje o una reducción de la unión, debido a la presencia del anticuerpo o del fragmento.

Alternativa o adicionalmente, cuando un anticuerpo que se une a IL-1 β o un fragmento que se une a IL-1 β bloquea sustancialmente la unión de IL-1 β a IL-1RI, la unión de IL-1 β a IL-1RI se reduce al menos 10 veces, alternativamente al menos aproximadamente 20 veces, alternativamente al menos aproximadamente 50 veces, alternativamente al menos aproximadamente 100 veces, alternativamente al menos aproximadamente 1000 veces, alternativamente al menos aproximadamente 10000 veces, o más, en comparación con la unión de las mismas concentraciones de IL-1 β e IL-1RI en ausencia del anticuerpo o fragmento. Otro ejemplo, cuando un anticuerpo que se une a IL-1 β o un fragmento que se une a IL-1 β permiten sustancialmente la unión de IL-1 β a IL-1RI, la unión de IL-1 β a IL-1RI es al menos aproximadamente 90%, alternativamente al menos aproximadamente 95%, alternativamente al menos aproximadamente 99%, alternativamente al menos aproximadamente 99,9%, alternativamente al menos aproximadamente 99,99%, alternativamente al menos aproximadamente 99,999%, alternativamente al menos aproximadamente 99,9999%, alternativamente sustancialmente idéntica a la unión de las mismas concentraciones de IL-1 β e IL-1RI en ausencia del anticuerpo o del fragmento.

La presente descripción puede incluir en ciertas realizaciones anticuerpos que se unen a IL-1 β o fragmentos que se unen a IL-1 β que se unen al mismo epítipo o a sustancialmente el mismo epítipo, que uno o varios de los anticuerpos ejemplares descritos en este documento. Alternativa o adicionalmente, los anticuerpos que se unen a IL-1 β o los fragmentos que se unen a IL-1 β compiten en la unión con un anticuerpo que tiene secuencias de la región variable de AB7, descrito en el documento de solicitud estadounidense 11/472813 o WO 2007/002261 (las secuencias se muestran a continuación). Alternativa o adicionalmente, la presente descripción incluye anticuerpos que se unen a IL-1 β y fragmentos que se unen a un epítipo contenido en la secuencia de aminoácidos ESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIE (SEQ ID NO: 1), un epítipo al que se unen los anticuerpos denominados AB5 y AB7 (documento de solicitud de EE.UU. nº 11/472813, WO 2007/002261). Tal y como se contempla en el presente documento, se puede determinar fácilmente si un anticuerpo o un fragmento que se une a IL-1 β , se une al mismo epítipo o a sustancialmente el mismo epítipo que uno o varios de los anticuerpos ejemplares, tal como por ejemplo el anticuerpo denominado AB7, utilizando cualquiera entre varios métodos conocidos en la técnica.

Por ejemplo, los residuos de aminoácidos claves (epítipo) unidos a un anticuerpo o un fragmento que se une a IL-1 β , se pueden determinar utilizando una matriz peptídica, tal como, por ejemplo, una matriz peptídica PepSpot[®] (JPT Peptide Technologies, Berlín, Alemania), en donde un escaneo de péptidos con doce aminoácidos, que abarcan toda la secuencia de aminoácidos de IL-1 β , estando solapado cada uno de los péptidos con 11 aminoácidos del anterior, se sintetiza directamente sobre una membrana. La membrana portadora de los péptidos se somete entonces a ensayo con el anticuerpo del que se solicita la información sobre la unión al epítipo, por ejemplo, a una concentración de 2 μ g/ml, durante 2 horas a temperatura ambiente. La unión del anticuerpo a los péptidos unidos a la membrana se puede detectar usando un anticuerpo secundario anti-humano de cabra conjugado con HRP (o de ratón, cuando sea apropiado), seguido por un aumento de la quimioluminiscencia (ECL). El(los) punto(s) de péptidos correspondiente a residuos o secuencias de aminoácidos particulares de la proteína madura IL-1 β , y que puntúan positivamente para la unión del anticuerpo, son indicativos de que el epítipo está unido con el anticuerpo particular.

Alternativa o adicionalmente, se pueden realizar experimentos de competencia con anticuerpos y tales ensayos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo o un fragmento se une a un epítipo contenido en una secuencia peptídica que comprende los aminoácidos ESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIE (SEQ ID NO: 1), que se corresponde a los residuos 83-105 de la forma madura de la proteína IL-1 β , se puede comparar un anticuerpo de especificidad desconocida con cualquier anticuerpo ejemplar (por ejemplo, AB7) de la presente descripción, de los que se sabe que se unen a un epítipo contenido dentro de esta secuencia. Los ensayos de competencia por la unión se pueden realizar, por ejemplo, usando un instrumento Biacore[®] para el análisis cinético de las interacciones de la unión o mediante ELISA. En dicho ensayo, el anticuerpo con una especificidad del epítipo desconocida se evalúa por su capacidad para competir por la unión frente al anticuerpo comparado conocido (por ejemplo, AB7). La competencia por la unión a un epítipo particular se determina por una reducción de la unión al

epítipo de IL-1 β , en al menos aproximadamente 50%, o al menos aproximadamente 70%, o al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 99% o aproximadamente 100% para el anticuerpo comparado conocido (por ejemplo, AB7) y es indicativa de la unión a sustancialmente el mismo epítipo.

- 5 En vista de la identificación en esta descripción de regiones que se unen a IL-1 β en anticuerpos y/o epítopos ejemplares, reconocidas por los anticuerpos descritos, se contempla que anticuerpos adicionales con similares características de unión y utilidad terapéutica o de diagnóstico, se pueden generar de forma que sean paralelos a las realizaciones de esta descripción.

10 Los fragmentos que se unen al antígeno de un anticuerpo incluyen fragmentos que conservan la capacidad para unirse específicamente a un antígeno, generalmente conservando la porción que se une al antígeno del anticuerpo. Está bien establecido que la función de unión al antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de porciones que se unen a antígeno incluyen (i) un fragmento Fab, que es un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, (ii) un fragmento F(ab')₂, que es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra, (iii) un fragmento Fd que es los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que es los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546), que es un dominio VH, y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Los anticuerpos de cadena sencilla también están incluidos dentro de la expresión porción que se une a antígeno de un anticuerpo. Los anticuerpos y los fragmentos que se unen a IL-1 β de la presente descripción también incluyen dominios de unión monovalentes o multivalentes, o monoméricos o multiméricos (por ejemplo tetaméricos), obtenidos a partir de CDR con o sin soporte (por ejemplo, un soporte proteico o de carbohidrato).

15 Los presentes anticuerpos o fragmentos que se unen a IL-1 β pueden ser parte de moléculas inmuno adhesivas mayores, formadas por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o una porción de anticuerpo, con una o varias otras proteínas o péptidos. Ejemplos de tales moléculas inmuno adhesivas incluyen el uso de la región central de estreptavidina para preparar una molécula tetramérica de scFv (Kipriyanov, S. M., et al., (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y un marcador de polihistidina C-terminal para preparar moléculas de scFv bivalentes y biotinizadas (Kipriyanov, S. M., et al., (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Los anticuerpos y los fragmentos que comprenden moléculas inmuno adhesivas se pueden obtener utilizando técnicas de ADN recombinante convencionales, tal y como se describen en la presente memoria. Las porciones preferidas que se unen al antígeno son dominios completos o parejas de dominios completos.

20 Los anticuerpos y los fragmentos que se unen a IL-1 β de la presente descripción también incluyen fragmentos de dominios de anticuerpos (dAb) (Ward et al., *Nature* 341:544-546, 1989), que consisten en un dominio V_H. Los anticuerpos y los fragmentos que se unen a IL-1 β de la presente descripción también incluyen diacuerpos, que son anticuerpos bivalentes en los que los dominios V_H y V_L se expresan en una única cadena polipeptídica, pero usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de este modo a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión al antígeno (véanse, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448, 1993 y Poljak et al., *Structure* 2:1121-1123, 1994). Los diacuerpos pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

25 Los anticuerpos y los fragmentos que se unen a IL-1 β de la presente descripción también incluyen fragmentos de anticuerpo con una sola cadena (scFv) que se unen a IL-1 β . Un scFv comprende una región variable de la cadena pesada (V_H) del anticuerpo, ligada funcionalmente a una región variable de la cadena ligera (V_L) del anticuerpo, en donde la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera, juntas o individualmente, forman un sitio de unión que se une a IL-1 β . Un scFv puede comprender una región V_H en el extremo amino-terminal y una región V_L en el extremo carboxi-terminal. Como alternativa, scFv puede comprender una región V_L en el extremo amino-terminal y una región V_H en el extremo carboxi-terminal. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, a través de un enlazador sintético que permite que se formen como una sola cadena proteica en la que la pareja de regiones V_L y V_H forman moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al., (1988) *Science* 242:423-426; y Huston et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883).

30 Un scFv puede comprender opcionalmente además un enlazador polipeptídico entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera. Tales enlazadores polipeptídicos comprenden en general entre 1 y 50 aminoácidos, alternativamente entre 3 y 12 aminoácidos, alternativamente 2 aminoácidos. Un ejemplo de un péptido enlazador para enlazar las cadenas pesada y ligera en un scFv comprende la secuencia de 5 aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 2). Otros ejemplos comprenden una o varias repeticiones en tándem de esta secuencia (por ejemplo, un polipéptido que comprende dos a cuatro repeticiones de Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 2) para crear enlazadores.

35 Los anticuerpos y los fragmentos que se unen a IL-1 β de la presente descripción también incluyen anticuerpos de la cadena pesada (HCAb). Las excepciones de la estructura H₂L₂ de los anticuerpos convencionales tienen lugar en algunos isotipos de las inmunoglobulinas que se encuentran en camélidos (camellos, dromedarios y llamas; Hamers-

Casterman et al., 1993 *Nature* 363: 446; Nguyen et al., 1998 *J. Mol. Biol.* 275: 413), tiburones Wobbegong (Nuttall et al., *Mol Immunol.* 38:313-26, 2001), tiburones nodriza (Greenberg et al., *Nature* 374:168-73, 1995; Roux et al., 1998 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 11.804) e *Hydrolagus collyei* (Nguyen et al., "Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation", 2002 *Immunogenetics* 54(1): 39-47). Estos anticuerpos pueden formar aparentemente regiones que se unen al antígeno usando solamente regiones variables de la cadena pesada, ya que estos anticuerpos funcionales son dímeros solamente de cadenas pesadas (denominados "anticuerpos de cadena pesada" o "HCAb"). Por consiguiente, algunas realizaciones de los presentes anticuerpos y fragmentos que se unen a IL-1 β pueden ser anticuerpos de cadena pesada que se unen específicamente a IL-1 β . Por ejemplo, los anticuerpos de cadena pesada que son una clase de IgG y están desprovistos de cadenas ligeras son producidos por animales del género *Camelidae*, que incluye a los camellos, los dromedarios y las llamas (Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993)). Los HCAbs tienen un peso molecular de aproximadamente 95 kDa en lugar de un peso molecular de aproximadamente 160 kDa de los anticuerpos IgG convencionales. Sus dominios de unión constan solamente de los dominios variables de la cadena pesada, denominados frecuentemente V_{HH} para distinguirlos de los V_H convencionales. Muyldermans et al., *J. Mol. Recognit.* 12:131-140 (1999). El dominio variable de los anticuerpos de cadena pesada se denomina a veces nanocuerpo (Cortez-Retamozo et al., *Cancer Research* 64:2853-57, 2004). Una biblioteca de nanocuerpos se puede generar a partir de un dromedario inmunizado tal y como se describe en Conrath et al., (*Antimicrob Agents Chemother* 45: 2807-12, 2001) o usando métodos recombinantes.

Puesto que el primer dominio constante (C_{H1}) está ausente (por corte y empalme durante el procesamiento del ARNm debido a la pérdida de una señal consenso de corte y empalme), el dominio variable (V_{HH}) está seguido inmediatamente por la región bisagra, los dominios C_{H2} y C_{H3} (Nguyen et al., *Mol. Immunol.* 36:515-524 (1999); Woolven et al., *Immunogenetics* 50:98-101 (1999)). Se ha informado de que V_{HH} de camélidos se recombina con las regiones constantes de IgG2 e IgG3 que contienen dominios bisagra, CH2 y CH3 y carecen de un dominio CH1 (Hamers-Casterman et al., *supra*). Por ejemplo, IgG1 de llama es un isotipo de anticuerpo convencional (H₂L₂) en el que V_H se recombina con una región constante que contiene los dominios bisagra, CH1, CH2 y CH3, mientras que IgG2 e IgG3 de llama son isotipos solo de cadena pesada que carecen de dominios CH1 y que no contienen cadenas ligeras.

Aunque los HCAbs están desprovistos de cadenas ligeras, tienen un repertorio de unión al antígeno. El mecanismo de generación genética de los HCAbs está revisado por Nguyen et al., *Adv. Immunol* 79:261-296 (2001) y Nguyen et al., *Immunogenetics* 54:39-47 (2002). Tiburones, como el tiburón nodriza, muestran dominios V monoméricos, simples que contienen un receptor del antígeno similar. Irving et al., *J. Immunol. Methods* 248:31-45 (2001); Roux et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:11804 (1998).

Los V_{HHS} comprenden pequeños fragmentos intactos que se unen al antígeno (por ejemplo, fragmentos que tienen aproximadamente 15 kDa, 118-136 residuos). Los dominios V_{HH} de camélido se ha encontrado que se unen al antígeno con alta afinidad (Desmyter et al., *J. Biol. Chem.* 276:26285-90, 2001), con afinidades de V_{HH} típicamente en el rango nanomolar y comparables con las de los fragmentos Fab y scFv. Los V_{HHS} son altamente solubles y más estables que los derivados correspondientes de fragmentos scFv y Fab. Los fragmentos V_H han sido relativamente difíciles de producir en forma soluble, pero se pueden conseguir mejoras en la solubilidad y la unión específica cuando los residuos estructurales son alterados para ser más similares a V_{HH}. (Véase, por ejemplo, Reichman et al., *J Immunol Methods* 1999, 231:25-38). Los V_{HHS} son portadores de sustituciones de aminoácidos que les hacen más hidrófilos y evitan una interacción prolongada con BiP (proteína que se une a la cadena pesada de la inmunoglobulina), que normalmente se une a la cadena H en el retículo endoplasmático (RE) durante el plegamiento y el ensamblaje, hasta que es desplazada por la cadena L. Debido a la hidrofilia incrementada de los V_{HHS}, aumenta la secreción desde el RE.

Los V_{HHS} funcionales pueden obtenerse por escisión proteolítica de HCAb de un camélido inmunizado, mediante clonación directa de los genes de V_{HH} procedentes de linfocitos B de un camélido inmunizado, dando como resultado V_{HHS} recombinantes, o a partir de bibliotecas naturales o sintéticas. Los V_{HHS} con una especificidad de antígeno deseada también se pueden obtener a través de la metodología de presentación en fagos. El uso de V_{HHS} en la presentación en fagos es mucho más sencillo y más eficaz en comparación con los Fabs o scFv, ya que solo se tiene que clonar y expresar un dominio para obtener un fragmento funcional que se une al antígeno. Muyldermans, *Biotechnol.* 74:277-302 (2001); Ghahroudi et al., *FEBS Lett.* 414:521-526 (1997) y van der Linden et al., *J. Biotechnol.* 80:261-270 (2000). Los métodos para generar anticuerpos que tienen cadenas pesadas de camélido también se describen en los documentos de publicación de Patente EE.UU. nº 20050136049 y 20050037421.

Los métodos de presentación en ribosomas se pueden utilizar para identificar y aislar moléculas de scFv y/o V_{HH} que tienen la actividad y la afinidad de unión al antígeno deseada. Irving et al., *J. Immunol. Methods* 248:31-45 (2001). La presentación y selección en ribosomas tiene el potencial de generar y mostrar grandes bibliotecas (10¹⁴).

Otras realizaciones proporcionan moléculas similares a V_{HH} generadas a través del proceso de camelización, mediante la modificación de V_{HS} no *Camelidae*, tales como V_{HHS} humanos, para mejorar su solubilidad e impedir una unión no específica. Esto se logra mediante la sustitución de residuos en el lado de V_{LS} de V_{HS}, con residuos similares a V_{HH}, imitando así los fragmentos de V_{HH} más solubles. Los fragmentos de V_H camelizados, en particular los basados en la parte estructural humana, se espera que presenten una respuesta inmune reducida en gran

medida cuando se administran *in vivo* a un paciente y, en consecuencia, se espera que tengan importantes ventajas para aplicaciones terapéuticas. Davies et al., *FEBS Lett.* 339:285-290 (1994); Davies et al., *Protein Eng.* 9:531-537 (1996); Tanha et al., *J. Biol. Chem.* 276:24774-24780 (2001); y Riechmann et al., *Immunol. Methods* 231:25-38 (1999).

5 Una amplia variedad de sistemas de expresión están disponibles para la producción de fragmentos de IL-1 β que incluyen fragmentos Fab, scFv y V_{HHS}. Por ejemplo, sistemas de expresión de origen procariótico y eucariótico se pueden utilizar para la producción a gran escala de fragmentos de anticuerpos y proteínas de fusión de anticuerpos. Son particularmente ventajosos los sistemas de expresión que permiten la secreción de grandes cantidades de fragmentos de anticuerpo en el medio de cultivo.

10 La producción de Fab-scFv biespecífico ("bicuerpo") y Fab-(scFv)₂ trispecífico ("tricuerpo") se describe en Schoonjans et al., (*J Immunol.* 165:7050-57, 2000) y Willems et al., (*J Chromatogr B Analyt Biomed Life Sci. Technol.* 786:161-76, 2003). Para los bicuerpos o tricuerpos, una molécula de scFv se fusiona con una o ambas cadenas VL-CL (L) y VH-CH1 (Fd), por ejemplo, para producir un tricuerpo, se fusionan dos scFv con el extremo C-terminal de Fab, mientras que en un bicuerpo, se fusiona un scFv con el extremo C-terminal de Fab. Un "minicuerpo" que consiste en scFv fusionado con CH3 por medio de un enlazador peptídico (sin bisagra) o por medio de una bisagra de IgG, ha sido descrito por Olafsen, et al., *Protein Eng. Des Sel.* Abril 2004; 17(4):315-23.

Los intracuerpos son anticuerpos de cadena sencilla que tienen expresión intracelular y pueden manipular la función de la proteína intracelular (Biocca, et al., *EMBO J.* 9:101-108, 1990; Colby et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 101:17616-21, 2004). Los intracuerpos, que comprenden secuencias de señales celulares que conservan la estructura artificial del anticuerpo en regiones intracelulares, se pueden producir tal y como describen Mhashikar et al., (*EMBO J* 14:1542-51, 1995) y Wheeler et al., (*FASEB J.* 17:1733-5, 2003). Los transcuerpos son anticuerpos permeables a las células en los que un dominio de transducción de proteínas (PTD) está fusionado con anticuerpos de fragmento variable de cadena sencilla (scFv), Heng et al., (*Med Hypotheses.* 64:1105-8, 2005).

Los anticuerpos y los fragmentos que se unen a IL-1 β de la presente descripción también incluyen anticuerpos que son SMIPs o proteínas de fusión de inmunoglobulinas con dominio de unión, específicas de la proteína diana. Estas estructuras artificiales son polipéptidos de cadena sencilla que comprenden dominios que se unen al antígeno fusionados con dominios de inmunoglobulinas necesarios para llevar a cabo las funciones efectoras de anticuerpos. Véanse, por ejemplo, los documentos WO03/041600, publicación de patente de EE.UU. 20030133939 y publicación de patente EE.UU. 20030118592.

Los anticuerpos y los fragmentos que se unen a IL-1 β de la presente descripción también incluyen inmuno adhesinas. Una o varias CDRs se pueden incorporar en una molécula de forma covalente o no covalente, para convertirla en una inmuno adhesina. Una inmuno adhesina puede incorporar la(s) CDR(s) como parte de una cadena polipeptídica más larga, puede enlazar covalentemente la(s) CDR(s) con otra cadena polipeptídica, o puede incorporar la(s) CDR(s) de forma no covalente. Las CDR descritas en este documento permiten que la inmuno adhesina se una específicamente a IL-1 β .

Los anticuerpos y los fragmentos que se unen a IL-1 β de la presente descripción también incluyen miméticos de anticuerpos que comprenden una o varias porciones que se unen a IL-1 β construidas sobre un soporte orgánico o molecular (tal como un soporte proteico o de carbohidrato). Las proteínas que tienen estructuras tridimensionales relativamente definidas, conocidas generalmente como soportes proteicos, pueden usarse como reactivos para el diseño de miméticos de anticuerpos. Estos soportes contienen típicamente una o varias regiones que son susceptibles de variar de forma específica o aleatoria una secuencia, y tal aleatorización de la secuencia se realiza frecuentemente para producir bibliotecas de proteínas a partir de las cuales se pueden seleccionar los productos deseados. Por ejemplo, un mimético de anticuerpo puede comprender un polipéptido quimérico que se une a una no inmunoglobulina, que tiene un dominio similar a la inmunoglobulina que contiene un soporte que tiene dos o varios bucles expuestos a disolvente que contienen una CDR diferente procedente de un anticuerpo parental insertado en cada uno de los bucles, y que muestra actividad de unión selectiva hacia un ligando unido por el anticuerpo parental. Los soportes proteicos de no inmunoglobulina se han propuesto para la obtención de proteínas con nuevas propiedades de unión. (Tramontano et al., *J. Mol. Recognit.* 7:9, 1994; McConnell y Hoess, *J. Mol. Biol.* 250:460, 1995). Otras proteínas han sido sometidas a ensayo como estructuras y se han utilizado para presentar residuos aleatorizados sobre superficies alfa helicoidales (Nord et al., *Nat. Biotechnol.* 15:772, 1997; Nord et al., *Protein Eng.* 8:601, 1995), bucles entre hélices alfa en haces de hélices alfa (Ku y Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:6552, 1995), y bucles limitados por puentes disulfuro, tales como los de los inhibidores pequeños de proteasa (Markland et al., *Biochemistry* 35:8045, 1996; Markland et al., *Biochemistry* 35:8058, 1996; Rottgen y Collins, *Gene* 164:243, 1995; Wang et al., *J. Biol. Chem.* 270:12250, 1995). Los métodos para emplear soportes para miméticos de anticuerpos se describen en los documentos de patente de EE.UU. 5.770.380 y las publicaciones de patentes de EE.UU. 2004/0171116, 2004/0266993 y 2005/0038229.

Los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos de IL-1 β preferidos para uso de acuerdo con la descripción, generalmente se unen a la IL-1 β humana con alta afinidad (por ejemplo, tal y como se determina con BIACORE y/o Kinexa), como por ejemplo con una constante de disociación de la unión en equilibrio (K_D) para IL-1 β de aproximadamente 10 nM o menor, aproximadamente 5 nM o menor, aproximadamente 1 nM o menor,

aproximadamente 500 pM o menor, o más preferiblemente de aproximadamente 250 pM o menor, aproximadamente 100 pM o menor, aproximadamente 50 pM o menor, aproximadamente 25 pM o menor, aproximadamente 10 pM o menor, aproximadamente 5 pM o menor, aproximadamente de 3 pM o menor, aproximadamente 1 pM o menor, aproximadamente 0,75 pM o menor, aproximadamente 0,5 pM o menor, o aproximadamente 0,3 pM o menor.

5 Los anticuerpos o los fragmentos de la presente descripción pueden unirse, por ejemplo, a IL-1 β , con una CI₅₀ de aproximadamente 10 nM o menor, aproximadamente 5 nM o menor, aproximadamente 2 nM o menor, aproximadamente 1 nM o menor, aproximadamente de 0,75 nM o menor, aproximadamente 0,5 nM o menor, aproximadamente 0,4 nM o menor, aproximadamente 0,3 nM o menor, o incluso aproximadamente 0,2 nM o menor, tal y como se determina con un ensayo inmunoenzimático (ELISA). Preferiblemente, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la presente descripción no reaccionan de forma cruzada con ninguna diana distinta de IL-1. Por ejemplo, los presentes anticuerpos y fragmentos pueden unirse a IL-1 β , pero no se unen de forma detectable a IL-1 α , o tienen al menos una selectividad aproximadamente 100 veces mayor (por ejemplo, al menos aproximadamente 150 veces mayor, al menos aproximadamente 200 veces mayor, o incluso al menos aproximadamente 250 veces mayor) en su unión a IL-1 β con respecto a su unión a IL-1 α . Los anticuerpos o fragmentos utilizados de acuerdo con la descripción pueden inhibir, en ciertas realizaciones, la expresión de IL-6 sérica inducida con IL-1 β en un animal, al menos un 50% (por ejemplo, al menos un 60%, al menos un 70%, o incluso al menos un 80%) en comparación con el nivel de IL-6 sérica en un IL-1 animal estimulado con IL-1 β , al que no se ha administrado un anticuerpo o un fragmento de la descripción. Los anticuerpos pueden unirse a IL-1 β pero permiten o permiten sustancialmente la unión del ligando unido a IL-1 β con el receptor de tipo I de IL-1 (IL-1RI). En contraste con muchos anticuerpos conocidos que se unen a IL-1 β que bloquean o interfieren sustancialmente en la unión de IL-1 β a IL-1RI, los anticuerpos denominados AB5 y AB7 (documento de solicitud de EE.UU. 11/472813, WO 2007/002261) se unen selectivamente al ligando de IL-1 β , pero permiten la unión del ligando unido a IL-1 β a IL-1RI. Por ejemplo, el anticuerpo denominado AB7, se une a un epítipo de IL-1 β pero todavía permite que la IL-1 β unida se una a IL-1RI. En ciertas realizaciones, el anticuerpo puede disminuir la afinidad de la interacción de IL-1 β unida para unirse a IL-1RI. Por consiguiente, la descripción proporciona, en un aspecto relacionado, el uso de un anticuerpo que se une a IL-1 β o un fragmento de anticuerpo que se une a IL-1 β , que tiene al menos una de las características mencionadas anteriormente. Cualquiera de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o polipéptidos anteriores de la descripción, puede estar humanizado o ser humano modificado genéticamente, tal y como se describe en la presente memoria.

Una variedad de los anticuerpos y los fragmentos de IL-1 (por ejemplo, IL-1 β) conocidos en la técnica, se pueden usar según los métodos proporcionados en la presente memoria, incluyendo por ejemplo, los anticuerpos descritos u obtenidos usando métodos descritos en los siguientes documentos de patentes y de solicitudes de patentes: US 4.935.343; US 2003/0026806; US 2003/0124617; WO 2006/081139; WO 03/034984; WO 95/01997; WO 02/16436; WO 03/010282; WO 03/073982; WO 2004/072116; WO 2004/067568; EP 0 267 611 B1; EP 0 364 778 B1; y solicitud de EE.UU. 11/472813. Como ejemplo no limitativo, los anticuerpos AB5 y AB7 (documentos de solicitud de EE.UU. 11/472813, WO2007/002261) se pueden usar de acuerdo con la descripción. Las secuencias de la región variable de AB5 y AB7 son tal y como se indica a continuación:

AB5

Cadena ligera

40 DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISN~~YLSWYQQKPDGTVKLLIYYT~~SKLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLE
QEDIATYFCL~~QGKMLPWF~~GGGKLEIK (SEQ ID NO: 3)

Las secuencias subrayadas representan (de izquierda a derecha) CDR1, 2 y 3.

Cadena pesada

45 QVTLKESGPGILKPSQTL~~SLTCSFSGFSL~~STSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDESYNPSLKTQLTISKDTSR
NQVFLKITSVDTVDATYFCARNRYDPPWFVDWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 4)

Las secuencias subrayadas representan (de izquierda a derecha) CDR1, 2 y 3.

AB7

Cadena ligera

50 DIQMTQSTSSLSASVGDRTITCRASQDISN~~YLSWYQQKPGKAVKLLIYYT~~SKLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ
QEDFATYFCL~~QGKMLPWF~~GGGKLEIK (SEQ ID NO: 5)

Las secuencias subrayadas representan (de izquierda a derecha) CDR1, 2 y 3.

Cadena pesada

QVQLQESGPGILVKPSQTL~~SLTCSFSGFSL~~STSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDESYNPSLKSRLTISKDTS
KNQVSLKITSVTAADTAVYFCARNRYDPPWFVDWGQGT TLVTVSS (SEQ ID NO: 6)

Las secuencias subrayadas representan (de izquierda a derecha) CDR1, 2 y 3.

Los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden preparar por cualquier método adecuado. Los métodos adecuados para la preparación de tales anticuerpos y fragmentos de anticuerpos son conocidos en la técnica. Otros métodos para preparar los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos son tal y como se describen en la presente memoria como parte de la descripción. El anticuerpo, el fragmento de anticuerpo o el polipéptido de la descripción, tal como se describen en la presente memoria, se pueden aislar o purificar hasta cualquier nivel. Tal y como se usa en este documento, un compuesto aislado es un compuesto que ha sido retirado de su entorno natural. Un compuesto purificado es un compuesto en el que se ha incrementado la pureza, de modo que el compuesto existe en una forma que es más pura que la que existe (i) en su entorno natural o (ii), cuando se sintetiza y/o amplifica inicialmente en condiciones de laboratorio, en donde "pureza" es un término relativo y no significa necesariamente "pureza absoluta".

Composiciones farmacéuticas

Los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos que se unen a IL-1 (por ejemplo, IL-1 β) para uso de acuerdo con la presente descripción, se pueden formular en composiciones, especialmente composiciones farmacéuticas, para el uso en los métodos de la presente invención. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une a IL-1 β de la descripción, en mezcla por adición de un vehículo adecuado, por ejemplo, un agente farmacéuticamente aceptable. Típicamente, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen a IL-1 β de la descripción están suficientemente purificados para la administración a un animal antes de la formulación en una composición farmacéutica.

Los agentes farmacéuticamente aceptables incluyen vehículos, excipientes, diluyentes, antioxidantes, conservantes, colorantes, agentes aromatizantes y diluyentes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, disolventes, cargas, agentes de carga, tampones, vehículos de entrega, agentes de tonicidad, codisolventes, agentes humectantes, agentes complejantes, agentes tamponantes, agentes antimicrobianos y tensioactivos.

La solución salina tamponada neutra o la solución salina mezclada con albúmina son ejemplos de vehículos apropiados. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween, Pluronic o polietilenglicol (PEG). También a modo de ejemplo, los agentes adecuados para mejorar la tonicidad incluyen haluros de metal alcalino (preferiblemente cloruro sódico o potásico), manitol, sorbitol y similares. Los conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio, tимерosal, alcohol de fenitilo, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico y similares. El peróxido de hidrógeno también se puede utilizar como conservante. Los codisolventes adecuados incluyen glicerina, propilenglicol y PEG. Los agentes complejantes adecuados incluyen cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina. Los tensioactivos o agentes humectantes adecuados incluyen ésteres de sorbitán, polisorbatos tales como polisorbato 80, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal y similares. Los tampones pueden ser tampones convencionales tales como acetato, borato, citrato, fosfato, bicarbonato o Tris-HCl. El tampón de acetato puede tener un pH de aproximadamente 4 a 5,5, y el tampón Tris puede tener un pH de aproximadamente 7 a 8,5. Agentes farmacéuticos adicionales se exponen en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18^a edición, A. R. Gennaro, compilador, Mack Publishing Company, 1990.

La composición puede estar en forma líquida o en forma liofilizada o en forma seca por congelación y puede incluir uno o varios lioprotectores, excipientes, agentes tensioactivos, aditivos de alto peso molecular estructurales y/o agentes de carga (véanse, por ejemplo, los documentos de patentes de EE.UU. 6.685.940, 6.566.329 y 6.372.716). En una realización, un lioprotector está incluido, que es un azúcar no reductor tal como sacarosa, lactosa o trehalosa. La cantidad de lioprotector incluida generalmente es tal que, tras la reconstitución, la formulación resultante será isotónica, aunque las formulaciones hipertónicas o ligeramente hipotónicas también pueden ser adecuadas. Además, la cantidad de lioprotector deberá ser suficiente para evitar una cantidad inaceptable de degradación y/o de agregación de la proteína tras la liofilización. Concentraciones ejemplares de lioprotector para azúcares (por ejemplo, sacarosa, lactosa, trehalosa) en la formulación preliofilizada son de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 400 mM. En otra realización, un agente tensioactivo está incluido, tal como por ejemplo, tensioactivos no iónicos y tensioactivos iónicos, tales como polisorbatos (por ejemplo, polisorbato 20, polisorbato 80); poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188); éteres fenílicos de polietilenglicol (por ejemplo, Triton); dodecil sulfato sódico (SDS); sulfato de sodio laurel; octil glicósido de sodio; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sulfobetaína; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sarcosina; linoleil-, miristil- o cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil- o isostearamidopropil-betaína (por ejemplo, lauroamidopropilo); miristamidopropil-, palmidopropil- o isostearamidopropil-dimetilamina; sodio metil cocoil-taurato o disodio metil ofeil-taurato; y las series de MONAQUAT[®] (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.), polietil glicol, polipropil glicol y copolímeros de etilenglicol y propilenglicol (por ejemplo, Pluronic, PF68, etc.). Ejemplos de cantidades de tensioactivos que pueden estar presentes en la formulación preliofilizada son desde aproximadamente 0,001-0,5%. Aditivos estructurales de peso molecular elevado (por ejemplo, materiales de carga, aglutinantes) pueden incluir, por

ejemplo, acacia, albúmina, ácido algínico, fosfato cálcico (dibásico), celulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa microcristalina, dextrano, dextrina, dextratos, sacarosa, tilosa, almidón pregelatinizado, sulfato cálcico, amilosa, glicina, bentonita, maltosa, sorbitol, etilcelulosa, fosfato disódico de hidrógeno, fosfato disódico, piro-sulfito disódico, poli(alcohol vinílico), gelatina, glucosa, goma guar, glucosa líquida, azúcar compresible, silicato de aluminio y magnesio, maltodextrina, óxido de polietileno, polimetacrilatos, povidona, alginato de sodio, celulosa microcristalina, tragacanto, almidón y zeína. Concentraciones ejemplares de aditivos estructurales con peso molecular elevado son desde 0,1% a 10% en peso. En otras realizaciones, se puede incluir un agente de carga (por ejemplo, manitol, glicina).

Las composiciones pueden ser adecuadas para la administración parenteral. Los ejemplos de composiciones son adecuados para inyección o infusión en un animal a través de cualquier vía disponible para el operario experto, tales como vía intraarticular, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimatosa), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intralesional, intrarrectal, transdérmica, oral y por inhalación. Una formulación parenteral será típicamente una solución estéril, exenta de pirógenos, acuosa isotónica, que contiene opcionalmente conservantes farmacéuticamente aceptables.

Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen medios salinos y tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, lactato de Ringer o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. Conservantes y otros aditivos también pueden estar presentes, tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, gases inertes y similares. Véase, en general, Remington's Pharmaceutical Science, 16^a ed., Mack compiladores, 1980, que se incorpora en esta memoria como referencia.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria se pueden formular para la administración controlada o sostenida de una manera que proporciona una concentración local del producto (por ejemplo, bolo, efecto de depósito) de liberación sostenida y/o aumento de la estabilidad o semivida en un entorno local particular. La descripción contempla que en ciertas realizaciones tales composiciones pueden incluir una cantidad significativamente mayor de anticuerpo o de fragmento en el depósito inicial, ya que la cantidad eficaz de anticuerpo o de fragmento realmente liberado y disponible en cualquier momento es, de acuerdo con la presente descripción, una cantidad mucho menor que la del depósito inicial. Las composiciones pueden incluir la formulación de anticuerpos que se unen a IL-1 β , fragmentos de anticuerpos, ácidos nucleicos o vectores de la descripción con preparaciones particuladas de compuestos poliméricos tales como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), etc., así como agentes, tales como una matriz biodegradable, microesferas inyectables, partículas microcapsulares, microcápsulas, perlas de partículas bioerosionables, liposomas y dispositivos de administración implantables que proporcionan una liberación controlada o sostenida del agente activo, que luego se puede administrar en forma de una inyección de depósito. Las técnicas para formular tales medios de liberación sostenida o controlada, son conocidas y se han desarrollado y utilizado una variedad de polímeros para la liberación controlada y la administración de fármacos. Tales polímeros son típicamente biodegradables y biocompatibles. Los hidrogeles poliméricos, que incluyen los formados por la formación de complejos de polímero enantiomérico o segmentos de polipéptidos, e hidrogeles con propiedades sensibles a la temperatura o al pH, pueden ser deseables para proporcionar un efecto de depósito de fármaco debido a las condiciones suaves y acuosas que intervienen en la captación de agentes proteicos bioactivos (por ejemplo, anticuerpos). Véase, por ejemplo, la descripción de la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la administración de composiciones farmacéuticas en el documento de publicación de la solicitud PCT WO 93/15722.

Los materiales adecuados para este propósito incluyen polilactidas (véase, por ejemplo, el documento de patente de EE.UU. 3.773.919), polímeros de poli-(ácidos α -hidroxicarboxílicos), tales como poli-(ácido D-(-)-3-hidroxi-butírico) (documento EP 133.988 A), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman et al., *Biopolymers*, 22: 547-556 (1983)), poli(2-hidroxietil-metacrilato) (Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15:167-277 (1981), y *Langer, Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982)), acetato de etileno vinilo o poli-(ácido D-(-)-3-hidroxi-butírico). Otros polímeros biodegradables incluyen poli(lactonas), poli(acetales), poli(ortoésteres) y poli(ortocarbonatos). Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas, que se pueden preparar según cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Eppstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688-92 (1985)). El vehículo en sí, o sus productos de degradación, no deberían ser tóxicos en el tejido diana y no deberían agravar el estado. Esto se puede determinar por el examen rutinario en modelos animales del trastorno diana o, en animales normales si tales modelos no están disponibles.

La microencapsulación de proteínas recombinantes para la liberación sostenida se ha realizado con éxito con hormona de crecimiento humana (rhGH), interferón (rhIFN-), interleucina-2 y MN rgp120. Johnson et al., *Nat. Med.*, 2:795-799 (1996); Yasuda, *Biomed. Ther.*, 27:1221-1223 (1993); Hora et al., *Bio/Technology*, 8:755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems" en *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell y Newman, compiladores, (Plenum Press: New York, 1995), págs. 439-462, documentos WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399, y la patente de EE.UU.

5.654.010. Las formulaciones de liberación sostenida de estas proteínas fueron desarrolladas utilizando polímero de poli-(ácido láctico-glicólico) (PLGA) debido a su biocompatibilidad y el amplio rango de propiedades biodegradables. Los productos de la degradación del PLGA, los ácidos láctico y glicólico se pueden eliminar rápidamente dentro del cuerpo humano. Además, la capacidad de degradación de este polímero puede depender de su peso molecular y composición. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer" en: M. Chasin y R. Langer (compiladores), *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (Marcel Dekker: Nueva York, 1990), págs.1-41. Ejemplos adicionales de composiciones de liberación sostenida incluyen, por ejemplo, los documentos EP 58.481 A, patente de EE.UU. n° 3.887.699, EP 158.277 A, patente canadiense 1176565, U. Sidman et al., *Biopolymers* 22, 547 [1983], R. Langer et al., *Chem. Tech.* 12, 98 [1982], Sinha et al., *J. Control. Release* 90, 261 [2003], Zhu et al., *Nat. Biotechnol.* 18, 24 [2000], y Dai et al., *Colloids Surf B Biointerfaces* 41, 117 [2005].

Los polímeros bioadhesivos también se contemplan para su uso en composiciones o con composiciones de la presente descripción. Los bioadhesivos son materiales sintéticos y de origen natural capaces de adherirse a sustratos biológicos durante períodos de tiempo prolongados. Por ejemplo, carbopol y policarbofilo son ambos derivados sintéticos reticulados de poli(ácido acrílico). Los sistemas de administración de bioadhesivos a base de sustancias de origen natural incluyen, por ejemplo, ácido hialurónico, también conocido como hialuronano. El ácido hialurónico es un mucopolisacárido natural que consiste en residuos de D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina. El ácido hialurónico se encuentra en la matriz tisular extracelular de los vertebrados, incluyendo los tejidos conectivos, así como en el líquido sinovial y en el humor vítreo y acuoso del ojo. Los derivados esterificados del ácido hialurónico se han utilizado para producir microesferas para su uso en la administración, que son biocompatibles y biodegradables (véase, por ejemplo, Cortivo et al., *Biomaterials* (1991) 12:727-730; documento de publicación europea n° 517.565; documento de publicación internacional n° WO 96/29998; Ilium et al., *J. Controlled Rel.* (1994) 29:133-141). Un ácido hialurónico ejemplar que contiene composiciones de la presente descripción, comprende un polímero de éster de ácido hialurónico en una cantidad desde aproximadamente 0,1% a aproximadamente 40% (p/p) de un anticuerpo o un fragmento que se une a IL-1 β , del polímero de ácido hialurónico.

Las dos matrices poliméricas biodegradables y no biodegradables se pueden utilizar para administrar composiciones de acuerdo con la descripción, y tales matrices poliméricas pueden comprender polímeros naturales o sintéticos. Se prefieren las matrices biodegradables. El período de tiempo durante el cual se produce la liberación se basa en la selección del polímero. Típicamente, es más deseable una liberación durante un período que oscila entre unas pocas horas y tres a doce meses. Ejemplos de polímeros sintéticos que se pueden utilizar para formar el sistema de administración biodegradable incluyen: polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, polialquilenglicoles, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, poli(alcoholes de vinilo), poli(éteres de vinilo), poli(ésteres de vinilo), poli(haluros de vinilo), polivinilpirrolidona, poliglicólidos, polisiloxanos, polianhídridos, poliuretanos y copolímeros de los mismos, poli(ácido bórico), poli(ácido valérico), alquilcelulosa, hidroxialquilcelulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitro celulosas, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, metil celulosa, etil celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, hidroxibutil metil celulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato butirato de celulosa, ftalato de acetato de celulosa, carboxiletil celulosa, triacetato de celulosa, sal sódica de sulfato de celulosa, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), poli(acrilato de octadecilo), polietileno, polipropileno, polietilenglicol, poli(óxido de etileno), poli(tereftalato de etileno), poli(alcoholes vinílicos), poli(acetato de vinilo), poli(cloruro de vinilo), poliestireno y polivinilpirrolidona. Ejemplos de polímeros naturales incluyen alginato y otros polisacáridos que incluyen dextrano y celulosa, colágeno, derivados químicos de los mismos (sustituciones, adiciones de grupos químicos, por ejemplo, alquilo, alquileo, hidroxilaciones, oxidaciones, y otras modificaciones realizadas rutinariamente por los expertos en la técnica), albúmina y otras proteínas hidrófilas, zeína y otras prolaminas y proteínas hidrófobas, copolímeros y mezclas de los mismos. En general, estos materiales se degradan ya sea por hidrólisis enzimática o exposición al agua *in vivo*, por erosión superficial o en la masa. El polímero está opcionalmente en forma de un hidrogel (véanse, por ejemplo, los documentos WO 04/009664, WO 05/087201, Sawhney, et al., *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587) que puede absorber hasta aproximadamente el 90% de su peso en agua y, además, está opcionalmente reticulado con iones multivalentes u otros polímeros.

Los sistemas de administración también incluyen sistemas no poliméricos que son lípidos que incluyen esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; revestimientos de cera; comprimidos que usan aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a: (a) sistemas de erosión en los que el producto está contenido en una forma dentro de una matriz, tal como las descritas en los documentos de patente de EE.UU. 4.452.775, 4.675.189 y 5.736.152 y (b) sistemas de difusión en los que un producto permea a una velocidad controlada desde un polímero tal y como se describe en los documentos de patente de EE.UU. 3.854.480, 5.133.974 y 5.407.686. Los liposomas que contienen el producto se pueden preparar por métodos conocidos, tales como por ejemplo (documento DE 3.218.121; Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688-3692 (1985); Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4.030-4034 (1980); documentos EP 52.322, EP 36.676, EP 88.046, EP 143.949, EP 142.641; solicitud de patente japonesa 83-118008; patentes US 4.485.045 y 4.544.545 y EP 102.324).

Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento que se une a IL-1 β , se puede formular

para inhalación, tal como por ejemplo, como un polvo seco. Las soluciones para inhalación se pueden formular también en un propulsor licuado para la administración en aerosol. En otra formulación, las soluciones se pueden nebulizar. Una composición farmacéutica adicional para la administración pulmonar incluye, aquellas descritas, por ejemplo, en el documento de publicación de solicitud PCT WO 94/20069, que describe la administración pulmonar de proteínas modificadas químicamente. Para la administración pulmonar, el tamaño de partícula debe ser adecuado para la administración hasta el pulmón distal. Por ejemplo, el tamaño de partícula puede ser de 1 μm a 5 μm ; sin embargo, se pueden utilizar partículas más grandes, por ejemplo, si cada partícula es bastante porosa.

Ciertas formulaciones que contienen anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen a IL-1 β se pueden administrar por vía oral. Las formulaciones administradas de esta manera pueden formularse con o sin los vehículos habitualmente utilizados en la composición de formas de dosificación sólidas, tales como comprimidos y cápsulas. Por ejemplo, una cápsula puede diseñarse para liberar la porción activa de la formulación en el lugar en el tracto gastrointestinal, cuando tiene la máxima biodisponibilidad y la degradación presistémica está minimizada. Se pueden incluir agentes adicionales para facilitar la absorción de un agente de unión selectivo. También se pueden emplear agentes diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes desintegrantes de comprimidos y aglutinantes.

Otra preparación puede implicar una cantidad eficaz de un anticuerpo o de un fragmento que se une a IL-1 β en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Mediante la disolución de los comprimidos en agua estéril, u otro vehículo apropiado, las soluciones se pueden preparar en forma de dosis unitaria. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, tales como carbonato cálcico, carbonato sódico o bicarbonato, lactosa o fosfato de calcio; o agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o goma arábiga; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Las formulaciones farmacéuticas adecuadas y/o preferidas se pueden determinar a la vista de la presente descripción y el conocimiento general de la tecnología de la formulación, dependiendo de la vía de administración pretendida, el formato de la administración y la dosificación deseada. Independientemente de la forma de administración, una dosis eficaz puede calcularse según el peso corporal del paciente, la superficie corporal o el tamaño del órgano. Un refinamiento adicional de los cálculos para determinar la dosificación apropiada para el tratamiento que implica cada una de las formulaciones descritas en la presente memoria, se realiza rutinariamente en la técnica y está dentro del ámbito de las tareas realizadas rutinariamente en la técnica. Las dosificaciones apropiadas se pueden determinar mediante el uso de datos apropiados de dosis-respuesta.

Las formulaciones adicionales serán evidentes considerando la presente descripción, que incluye las formulaciones que implican anticuerpos y fragmentos que se unen a IL-1 β en combinación con uno o varios otros agentes terapéuticos. Por ejemplo, en algunas formulaciones, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une a IL-1 β , un ácido nucleico o un vector de la descripción se formula con un segundo inhibidor de una vía de señalización de IL-1. Los inhibidores secundarios representativos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, péptidos, polipéptidos, compuestos, ácidos nucleicos, vectores y composiciones farmacéuticas, tales como, por ejemplo, descritas en los documentos US 6899878, US 2003022869, US 20060094663, 20050186615 US, US 20030166069, WO/04022718, WO/05084696, WO/05019259. Por ejemplo, una composición puede comprender un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo que se une a IL-1 β , un ácido nucleico o un vector de la descripción en combinación con otro anticuerpo, fragmento que se une a IL-1 β o un ácido nucleico o un vector que codifica tal anticuerpo o fragmento.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender anticuerpos o fragmentos que se unen a IL-1 β en combinación con otros agentes activos. Tales combinaciones son las útiles para su finalidad prevista. Las combinaciones que forman parte de esta descripción pueden ser anticuerpos y fragmentos de IL-1 β , tales como por ejemplo, los descritos en esta memoria, y al menos un agente adicional. Ejemplos de agentes activos que se pueden utilizar en combinación, descritos a continuación, son ilustrativos para los propósitos y no pretenden estar limitados a los mismos. La combinación también puede incluir más de un agente adicional, por ejemplo, dos o tres agentes adicionales si la combinación es tal que la composición formada puede realizar su función prevista.

La descripción contempla además que las composiciones farmacéuticas que comprenden uno o varios agentes activos, pueden administrarse separadamente de los anticuerpos o fragmentos que se unen a IL-1 β , y dichas administraciones separadas se pueden realizar en el mismo momento o en diferentes momentos, tal como por ejemplo el mismo día o días diferentes. La administración del otro agente activo puede estar de acuerdo con las prácticas médicas convencionales, conocidas en la técnica, o la administración se puede modificar (por ejemplo, intervalos más largos, dosificaciones más pequeñas, iniciación retardada) cuando se utiliza junto con la administración de anticuerpos o fragmentos que se unen a IL-1 β , tal y como se describe en esta memoria.

Los agentes activos o las combinaciones con los presentes anticuerpos o fragmentos incluyen indometacina, fármacos no esteroideos antiinflamatorios (AINEs), tales como la aspirina, el ibuprofeno y otros derivados del ácido propiónico (alminoprofeno, benoxaprofeno, ácido buclóxico, carprofeno, fenbufeno, fenoprofeno, fluprofeno, flurbiprofeno, indoprofeno, cetoprofeno, miroprofeno, naproxeno, oxaprozina, piroprofeno, pranoprofeno, suprofeno, ácido tiaprofénico y tiopropofeno), derivados del ácido acético (indometacina, acemetacina, alclofenaco, clidanaco, diclofenaco, fenclofenaco, ácido fenclóxico, fentiazaco, furofenac, ibufenaco, isoxepaco, oxpinaco, sulindaco,

tiopinaco, tolmetina, zidometacina y zomepirac), derivados del ácido fenámico (ácido flufenámico, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido niflúmico y ácido tolfenámico), derivados del ácido bifencilcarboxílico (diflunisal y flufenisal), oxicams (isoxicam, piroxicam, sudoxicam y tenoxicam), salicilatos (ácido acetil salicílico, sulfasalazina) y las pirazonas (apazona, bezpiperilón, feprazona, mofebutazona, oxifenbutazona, fenilbutazona).

5 Otras combinaciones incluyen metotrexato, inhibidores de ciclooxigenasa-2 (COX-2), agentes anti-TNF (por ejemplo, adalimumab, etanercept, infliximab) y agentes anti-IL-1, anti-IL-15, anti-IL-18 y anti-IL-21. Otros agentes activos para combinación incluyen glucocorticoides o esteroides tales como prednisolona, prednisona, metilprednisolona, betametasona, dexametasona o hidrocortisona. Tal combinación puede ser especialmente ventajosa, ya que se puede reducir uno o varios efectos secundarios del esteroide o incluso eliminar, reduciendo gradualmente la dosis de esteroides requerida cuando se tratan pacientes en combinación con los presentes anticuerpos y fragmentos.

10 Se contempla además que un anticuerpo o un fragmento anti-IL-1 β administrado a un individuo de acuerdo con la descripción, se puede administrar en combinación con un tratamiento con al menos un agente activo adicional, tal como por ejemplo, cualquiera de los agentes activos mencionados anteriormente. En una realización, el tratamiento con al menos un agente activo se mantiene. En otra realización, el tratamiento con al menos un agente activo se reduce o se interrumpe (por ejemplo, cuando el individuo está estable) durante el curso del tratamiento con anticuerpos de IL-1 β (por ejemplo, con el anticuerpo o el fragmento anti-IL-1 β mantenido en un régimen de dosificación constante). En otra realización, el tratamiento con al menos un agente activo se reduce o se interrumpe (por ejemplo, cuando el individuo está estable), y se reduce el tratamiento con el anticuerpo o el fragmento anti-IL-1 β (por ejemplo, una dosis más baja, menos frecuencia de dosificación, un régimen de tratamiento más corto). En otra realización, el tratamiento con al menos un agente activo se reduce o se interrumpe (por ejemplo, cuando el individuo está estable), y el tratamiento con el anticuerpo o el fragmento anti-IL-1 β se incrementa (por ejemplo, una dosis más alta, una dosificación más frecuente, un régimen de tratamiento más largo). En aún otra realización, el tratamiento con al menos un agente activo se mantiene y el tratamiento con el anticuerpo o el fragmento anti-IL-1 β se reduce o se interrumpe (por ejemplo, una dosis más baja, una dosificación menos frecuente, un régimen de tratamiento más corto). En aún otra realización, el tratamiento con al menos un agente activo y el tratamiento con el anticuerpo o el fragmento anti-IL-1 β se reducen o se interrumpen (por ejemplo, una dosis más baja, una dosificación menos frecuente, un régimen de tratamiento más corto).

15 Las composiciones farmacéuticas utilizadas en la descripción pueden incluir una cantidad terapéuticamente eficaz o una cantidad profilácticamente eficaz de los anticuerpos o fragmentos que se unen a IL-1 β . Una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a una cantidad eficaz, con dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o de una porción del anticuerpo puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o de la porción de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o de la porción de anticuerpo es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una cantidad profilácticamente eficaz se refiere a una cantidad eficaz, con dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios para lograr el resultado profiláctico deseado.

20 Una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento que se une a IL-1 β dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos, tales como la indicación para la que se utiliza la composición, la vía de administración y el estado del individuo. Las composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz para tratar una afección relacionada con IL-1.

Métodos de uso

25 Los anticuerpos anti-IL-1 β tal y como se proporcionan en esta memoria se pueden utilizar para el tratamiento y/o la prevención de la artritis reumatoide en un individuo. Tales métodos pueden utilizarse para tratar un individuo mamífero (por ejemplo, humano) que padece artritis reumatoide o para evitar la aparición de la misma en un individuo con riesgo de padecerla. Tales métodos también pueden utilizarse para el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad multisistémica inflamatoria neonatal (NOMID/CINCA), la artritis idiopática juvenil sistémica, la osteoartritis, la aterosclerosis, la miastenia grave, síndromes periódicos asociados con CIASI (CAPS), la enfermedad de Stills o el síndrome de Muckle-Wells.

30 Los términos "prevención", "evita", "evitar", "prevenir", "suprimir", "suprime", "inhibir" e "inhibición" tal y como se usan en esta memoria, se refieren al curso de una acción (como la administración de un compuesto o una composición farmacéutica) iniciado de una manera (por ejemplo, antes de la aparición de un síntoma clínico de un estado de enfermedad o trastorno), así como para evitar, suprimir o reducir, ya sea temporal o permanentemente, el comienzo de una manifestación clínica del estado de enfermedad o trastorno. Tal prevención, supresión o reducción no tiene que ser absoluta para ser útil.

35 Los términos "tratamiento", "tratar" y "tratando" tal y como se emplean en esta memoria, se refieren al curso de una acción (tal como la administración de un compuesto o una composición farmacéutica) iniciado después de la aparición de un síntoma clínico de un estado de enfermedad o trastorno, con el fin de eliminar, reducir, suprimir o mejorar, ya sea temporal o permanentemente, una manifestación clínica o la progresión del estado de enfermedad o

trastorno. Tal tratamiento no tiene que ser absoluto para ser útil.

La expresión "con necesidad de tratamiento" tal y como se usa en esta memoria, se refiere a un juicio hecho por un profesional sanitario de que un paciente requiere o se beneficiará de un tratamiento. Este juicio se realiza basándose en una diversidad de factores que están en el ámbito de la experiencia del profesional sanitario, pero que incluye el conocimiento de que el paciente está enfermo, o estará enfermo, como resultado de una afección que es tratable mediante un método o un compuesto de la descripción.

La expresión "con necesidad de prevención", tal y como se usa en esta memoria, se refiere a un juicio hecho por un profesional sanitario de que un paciente requiere o se beneficiará de una prevención. Este juicio se realiza basándose en una diversidad de factores que están en el ámbito de la experiencia del profesional sanitario, pero que incluye el conocimiento de que el paciente enfermará o puede enfermar, como resultado de una afección que se puede prevenir mediante un método o un compuesto de la descripción.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" tal y como se usa en esta memoria, se refiere a una cantidad de un compuesto (por ejemplo, anticuerpo), ya sea aislado o como parte de una composición farmacéutica, que es capaz de tener cualquier efecto detectable, positivo sobre cualquier síntoma, aspecto o característica de un estado de enfermedad o trastorno, cuando se administra a un paciente (por ejemplo, en forma de una o varias dosis). Tal efecto no necesita ser absoluto para ser beneficioso.

En una realización, el anticuerpo o el fragmento anti-IL-1 β se administra a un individuo con artritis reumatoide y el individuo también recibe al menos otro tratamiento aceptado médicamente (por ejemplo, medicación, fármaco, agente terapéutico, agente activo) de la enfermedad, afección o complicación. En otra realización, al menos el otro tratamiento aceptado médicamente de la enfermedad, afección o complicación se reduce o se interrumpe (por ejemplo, cuando el individuo está estable), mientras que el tratamiento con el anticuerpo o el fragmento de anti-IL-1 β se mantiene con un régimen de dosificación constante. En otra realización, al menos el otro tratamiento aceptado médicamente de la enfermedad, afección o complicación se reduce o se interrumpe (por ejemplo, cuando el individuo está estable), y el tratamiento con el anticuerpo o el fragmento anti-IL-1 se reduce (por ejemplo, una dosis más baja, una dosificación menos frecuente, un régimen de tratamiento más corto). En otra realización, al menos el otro tratamiento aceptado médicamente de la enfermedad, afección o complicación se reduce o se interrumpe (por ejemplo, cuando el individuo está estable), y el tratamiento con el anticuerpo o el fragmento anti-IL-1 se incrementa (por ejemplo, una dosis más alta, una dosificación más frecuente, un régimen de tratamiento más largo). En aún otra realización, al menos el otro tratamiento aceptado médicamente de la enfermedad, afección o complicación se mantiene y el tratamiento con el anticuerpo o el fragmento anti-IL-1 se reduce o se interrumpe (por ejemplo, una dosis más baja, una dosificación menos frecuente, un régimen de tratamiento más corto). En aún otra realización, al menos el otro tratamiento aceptado médicamente de la enfermedad, afección o complicación y el tratamiento con el anticuerpo o el fragmento anti-IL-1 se reducen o se interrumpen (por ejemplo, una dosis más baja, una dosificación menos frecuente, un régimen de tratamiento más corto).

En los métodos preferidos para tratar o evitar la artritis reumatoide, el anticuerpo anti-IL-1 β o el fragmento del mismo se administra al individuo de acuerdo con los números de dosis, las cantidades por dosis y/o los intervalos entre dosis mencionados anteriormente. Alternativamente, el anticuerpo o el fragmento anti-IL-1 β se pueden administrar como una o varias dosis iniciales de las cantidades mencionadas anteriormente que son inferiores a una o a varias cantidades de dosis posteriores. Al proporcionar la(s) dosis inicial(es) en una cantidad más baja, se puede mejorar la eficacia y/o la tolerabilidad del tratamiento. Por ejemplo, en una realización no limitante de la descripción, una o varias dosis iniciales (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5) de una cantidad de anticuerpo o de fragmento ≤ 1 mg/kg (por ejemplo, $\leq 0,9$ mg/kg, $\leq 0,8$ mg/kg, $\leq 0,7$ mg/kg, $\leq 0,6$ mg/kg, $\leq 0,5$ mg/kg, $\leq 0,4$ mg/kg, $\leq 0,3$ mg/kg, $\leq 0,2$ mg/kg, $\leq 0,1$ mg/kg, $\leq 0,05$ mg/kg, $\leq 0,03$ mg/kg, $\leq 0,01$ mg/kg) se pueden administrar, seguidas por una o varias dosis subsiguientes en una cantidad mayor que la dosis inicial (por ejemplo, $\geq 0,01$ mg/kg, $\geq 0,03$ mg/kg, $\geq 0,1$ mg/kg, $\geq 0,3$ mg/kg, $\geq 0,5$ mg/kg, $\geq 0,6$ mg/kg, $\geq 0,7$ mg/kg, $\geq 0,8$ mg/kg, $\geq 0,9$ mg/kg, $\geq 1,0$ mg/kg, $\geq 1,5$ mg/kg, ≥ 2 mg/kg, $\geq 2,5$ mg/kg, ≥ 3 mg/kg, $\geq 3,5$ mg/kg, ≥ 4 mg/kg, $\geq 4,5$ mg/kg, ≥ 5 mg/kg). La descripción contempla que cada dosis de anticuerpo o de fragmento se puede administrar en uno o más sitios.

Los métodos para tratar o evitar una enfermedad o una afección de acuerdo con la presente descripción, pueden utilizar una programación predeterminada o de "rutina" para la administración del anticuerpo o del fragmento. Tal y como se utiliza en la presente memoria, una programación de rutina se refiere a un período de tiempo predeterminado propuesto entre las administraciones de la dosis. La programación de rutina puede incluir períodos de tiempo que son idénticos o que se diferencian en la longitud, siempre y cuando la programación está predeterminada. Cualquier combinación particular estaría incluida en la programación rutinaria, siempre y cuando se determine de antemano que el programa adecuado implica la administración en un día determinado.

La descripción contempla además que los anticuerpos o fragmentos de IL-1 β utilizados de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente memoria, se pueden administrar en combinación con métodos de tratamiento y composiciones farmacéuticas más tradicionales (por ejemplo, agentes activos). Tales composiciones pueden incluir, por ejemplo, cualquier método de tratamiento aprobado para la indicación de la enfermedad. En ciertas realizaciones, los anticuerpos y los fragmentos utilizados de acuerdo con la descripción pueden evitar o retrasar la necesidad de métodos de tratamiento o composiciones farmacéuticas adicionales. En otras realizaciones, los

anticuerpos o los fragmentos pueden reducir la cantidad, la frecuencia o la duración de los métodos de tratamiento o las composiciones farmacéuticas adicionales.

5 Alternativamente, los métodos de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección de acuerdo con la presente descripción, pueden utilizar una programación para la administración del anticuerpo o del fragmento que se basa en la presencia de síntomas de la enfermedad y/o cambios en alguna de las determinaciones de la presente memoria, como un medio para determinar cuándo administrar una o varias dosis subsiguientes. De forma similar, este enfoque puede ser utilizado como un medio para determinar si una dosis posterior se debe aumentar o disminuir, basándose en el efecto de una dosis previa.

10 El diagnóstico de tales enfermedades o afecciones en pacientes, o, alternativamente, el riesgo de desarrollar este tipo de enfermedades o afecciones puede estar de acuerdo con las prácticas médicas convencionales conocidas en la técnica. Después de la administración de un anticuerpo o un fragmento de anti-IL-1 β , las evaluaciones clínicas para un tratamiento o un efecto preventivo sobre la artritis reumatoide son bien conocidas en la técnica y se pueden utilizar como un medio para vigilar la efectividad de los métodos de la descripción. Por ejemplo, la respuesta al tratamiento de la AR se puede determinar basándose en una evaluación clínica, como por ejemplo, los criterios esenciales de respuesta según la escala de ACR, como un medio para medir el estado de la enfermedad. Los criterios esenciales de respuesta según ACR incluyen los siguientes componentes: número de articulaciones doloridas e inflamadas, evaluación de dolor del individuo, evaluación global del individuo, evaluación global del médico, discapacidad autoevaluada por el individuo con el cuestionario de evaluación de la salud [HAQ], y reactivos de fase y aguda (ESR o CRP). Los componentes de los criterios esenciales de respuesta según ACR se pueden analizar utilizando tanto criterios de respuesta según ACR (es decir, ACR20, ACR50 y ACR70) y el índice de actividad de la enfermedad (DAS) 28-CRP. En una realización, la eficacia del tratamiento se evalúa por una reducción del dolor articular de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o aproximadamente 100%. En otra realización, la reducción del dolor articular se produce en menos de aproximadamente 48 horas, menos de aproximadamente 36 horas, menos de aproximadamente 24 horas.

25 Uno o varios criterios de evaluación secundarios, tales como por ejemplo los niveles de proteína C reactiva (CRP) y/o la velocidad de sedimentación eritrocítica (ESR), también se pueden determinar con el fin de evaluar la eficacia del tratamiento. Una disminución en los niveles de CRP de $\geq 0,2$, $\geq 0,4$, $\geq 0,6$, $\geq 0,8$, $\geq 1,0$, $\geq 1,4$, $\geq 1,8$, $\geq 2,2$, $\geq 2,6$, $\geq 3,0$ mg/L; alternativamente un descenso en CRP de $>20\%$, $>30\%$, $>40\%$, $>50\%$, $>60\%$, $>70\%$, $>80\%$, $>90\%$, $>95\%$ desde los niveles previos al tratamiento, es indicativo del efecto terapéutico. Una disminución en ESR de $>20\%$, $>30\%$, $>40\%$, $>50\%$, $>60\%$, $>70\%$, $>80\%$, $>90\%$, $>95\%$, $>98\%$ desde los niveles previos al tratamiento, es indicativa del efecto terapéutico.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos están destinados meramente a ilustrar adicionalmente la puesta en práctica de la presente descripción, pero no deben interpretarse en modo alguno como limitantes de su alcance.

35 Ejemplo 1

Inhibición de IL-1 β empleando un anticuerpo de IL-1 β de alta afinidad en un ensayo basado en células *in vitro*, con una producción de IL-8 inducida con IL-1 como parámetro indicador.

40 El efecto inhibitor del anticuerpo específico de IL-1 β se comparó con un no inhibitor del anticuerpo de la ruta de IL-1, Kineret[®] (anakinra), que es un antagonista recombinante del receptor de IL-1 (IL-1Ra). Sangre periférica heparinizada de nuevo aporte, se obtuvo a partir de donantes sanos. Se extendieron en placas 180 μ l de sangre completa en una placa de 96 pocillos y se incubaron con diversas concentraciones del anticuerpo AB7 (documento de solicitud estadounidense 11/472.813, WO 2007/002261) y rhIL-1 β 100 pM. Para las muestras tratadas con Kineret[®], se combinaron Kineret[®] y rhIL-1 β 1:1 antes de mezclar con la sangre. Las muestras se incubaron durante 6 horas a 37°C con CO₂ al 5%. A continuación, las células de la sangre completa se lisaron con 50 μ l de Triton X-100 al 2,5%. La concentración de interleucina-8 (IL-8) en los lisados aclarados se sometió a ensayo con ELISA (kit de ELISA para IL-8 humana de Quantikine, R&D Systems) según las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de IL-8 en las muestras tratadas con AB7 y con Kineret[®] se compararon con una muestra testigo tratada con testigo anti-KLH. Los resultados se muestran en la Fig. 1 y se resumen en la Tabla 6. La CI₅₀ es la concentración de anticuerpo requerida para inhibir el 50% de la IL-8 liberada mediante estimulación de IL-1 β .

50

Tabla 1

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

Estos resultados muestran la potencia *in vitro* de AB7, según se mide por la inhibición de la liberación de IL-8 estimulada con IL-1 β . Los resultados que muestran una mayor potencia en comparación con Kineret[®], indican que el anticuerpo tendrá una eficacia inhibitora de IL-1 β *in vivo*.

Ejemplo 2

Inhibición *in vivo* de la actividad biológica de IL-1 β humana empleando anticuerpos específicos de IL-1 β , según lo determinado por el impacto de la liberación de IL-6 estimulada con IL-1 β .

5 Para confirmar la eficacia *in vivo* de AB7, se sometió a ensayo su capacidad para bloquear la actividad biológica de IL-1 β en ratones. Los detalles del ensayo se describen en Economides et al., *Nature Med.*, 9: 47-52 (2003). Brevemente, ratones machos C57/B16 (Jackson Laboratory Bar Harbor, Maine) fueron inyectados intraperitonealmente con dosis tituladas de AB7, otro anticuerpo de IL-1 β , AB5 o un anticuerpo testigo. Veinticuatro horas después de la inyección de anticuerpo, los ratones fueron inyectados subcutáneamente con IL-1 β humana recombinante (rhIL-1 β) (de PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ) con una dosis de 1 μ g/kg. Dos horas después de la inyección de rhIL-1 β (tiempo de respuesta pico de IL-6), se sacrificaron los ratones, se recogió la sangre y se procesó para suero. Los niveles séricos de IL-6 se sometieron a ensayo con ELISA (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ) según el protocolo del fabricante. El porcentaje de inhibición se calculó a partir de la relación de la IL-6 detectada en el suero del animal experimental, con la IL-6 detectada en el suero del animal testigo (multiplicado por 100).

15 Los resultados se exponen en la Figura 2A. La capacidad para inhibir la actividad *in vivo* de IL-1 β se determinó como una función de los niveles en suero de IL-6 estimulada con IL-1 β . Tal y como se ilustra en la Figura 2A, los anticuerpos AB5 y AB7 fueron eficaces para inhibir la actividad *in vivo* de IL-1 β humana. Estos resultados también muestran que una única inyección de AB7 o AB5 puede bloquear la acción sistémica frente a la estimulación de IL-1 β y que estos anticuerpos son útiles para la inhibición de la actividad de IL-1 β *in vivo*.

20 Un experimento similar se realizó para demostrar adicionalmente la capacidad de AB7 para neutralizar IL-1 β de ratón *in vivo*, para respaldar el uso de este anticuerpo en modelos de ratón de la enfermedad. Se determinó que AB7 tiene una afinidad hacia IL-1 β humana que es \sim 10.000 veces superior a la afinidad hacia IL-1 β de ratón, y una potencia *in vitro* en el ensayo D10.G4.1 ensayo que es \sim 1.000 veces superior a la de IL-1 β de ratón. En el modelo de ratón C57BL/6 con parámetro indicador de IL-6, los ratones fueron inyectados i. p. con AB7 (3 o 300 μ g) o testigo de vehículo PBS, 24 horas antes de una inyección subcutánea de IL-1 β (20 ng) humana (Figura 2B, panel A) o de ratón (Figura 2B, panel B). La sangre se extrajo 2 horas más tarde y las muestras de suero se analizaron para estudiar los niveles de IL-6 mediante ELISA. Estos datos muestran la supresión máxima de los niveles de IL-6 (\sim 75%) inducida por IL-1 β humana a 3 μ g (panel A), mientras que la supresión submáxima de los niveles de IL-6 (\sim 50%) inducida por IL-1 β de ratón, se mostró con 300 μ g (panel B). Estos resultados son compatibles con la observación de que hay una mayor afinidad y potencia *in vitro* del anticuerpo AB7 para IL-1 β humana, en comparación con IL-1 β de ratón. Además, los datos indican que este anticuerpo se puede utilizar para modelos de enfermedad en ratón *in vivo* con una dosis superior apropiada a la que se necesitaría para el tratamiento de individuos humanos, en donde el anticuerpo tiene una afinidad y una potencia muy superiores. En el caso de otros anticuerpos de IL-1 β , tales como por ejemplo, otros anticuerpos descritos y/o citados en este documento, que no muestran una afinidad significativamente menor y una potencia *in vitro* menor para IL-1 β de ratón, pueden no ser necesarios unos ajustes de dosis más altas en modelos de ratón.

Ejemplo 3

Farmacocinética de un anticuerpo anti-IL-1 β .

40 Para examinar el perfil farmacocinético, un anticuerpo de IL-1 β denominado AB7 se administró a ratas macho adultas como un bolo intravenoso (IV) en la vena de la cola, con dosis de 0,1, 1,0 o 10 mg/kg (grupos 1, 2, y 3, respectivamente) o una dosis subcutánea (SC) entre los omóplatos de 1,0 mg/kg (grupo 4). Las muestras de sangre se recogieron a través de la cánula en la vena yugular o del seno retro-orbital en momentos determinados, durante un máximo de 91 días después de la dosificación. Las muestras de sangre se centrifugaron para obtener el suero. Las muestras se analizaron para estudiar la concentración de anticuerpo anti-IL-1 β usando un ensayo de ELISA basado en fosfatasa alcalina, del modo siguiente.

45 IL-1 β (Preprotech) se diluyó hasta 0,5 μ g/ml en PBS y 50 μ L de esta solución se añadieron a los pocillos de placas de microtitulación de Nunc-Immuno Maxisorp (VWR) y se incubaron durante una noche a 2-8°C. La solución de antígeno se retiró y se añadieron 200 μ L de tampón de bloqueo [1% de seroalbúmina bovina (BSA) en 1 x PBS que contenía 0,05% de Tween 20] a todos los pocillos y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del bloqueo, los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado (1 x PBS, que contenía 0,05% de Tween 20). Patrones, muestras y testigos se diluyeron en diluyente de la muestra (25% de suero de rata en 1x PBS que contenía 1% de BSA y 0,05% de Tween 20). Soluciones convencionales de anticuerpo anti-IL-1 β se prepararon como una serie de dos diluciones desde 2000 hasta 0,24 ng/mL. Cada réplica y la dilución de los patrones, muestras y testigos (50 μ L) se transfirieron a las placas de microtitulación bloqueadas y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Después de la incubación, los pocillos se lavaron 3 veces con tampón de lavado. Anticuerpo de IgG (H + L) anti-humano de cabra, conjugado con fosfatasa alcalina (Southern Biotech Associates Inc., Birmingham, AL) se diluyó 1/1000 en diluyente de conjugado (1% de BSA en 1x PBS que contiene 0,05% de Tween 20). Cincuenta μ L del conjugado diluido se añadieron a todos los pocillos a excepción de los pocillos vacíos, que recibieron solo 50 μ L de diluyente del conjugado. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C y luego todos los pocillos se lavaron 3 veces

con tampón de lavado y 3 veces con agua desionizada. El sustrato p-nitrofenilfosfato (1 mg/ml en tampón de dietanolamina al 10%, pH 9,8) se añadió a todos los pocillos y se permitió el revelado de color y se dejó proceder durante 1 hora a temperatura ambiente, después de lo cual se añadieron 50 µL de NaOH 1 N para detener la reacción. La absorbancia a 405 nm se determinó usando un espectrofotómetro M2 lector de placas de Spectramax (Molecular Devices, Menlo Park, CA) y se representó a continuación una curva estándar como A_{405} frente a ng/ml de anticuerpo convencional. Se realizó un análisis de la regresión y se determinaron las concentraciones de las muestras y los testigos mediante interpolación de la curva estándar. El límite de cuantificación fue de 40 ng/ml.

Como se muestra en la Figura 3, las concentraciones séricas disminuyeron biexponencialmente entre los grupos de dosis IV. Se realizó un análisis compartimental sobre los datos individuales de los animales, y los parámetros farmacocinéticos resultantes se promediaron para cada grupo de dosis, excluyendo aquellos animales en los que se generó una respuesta RAHA. Los niveles séricos de anticuerpo anti-IL-1 β disminuyeron con una semivida promedio en fase alfa de $0,189 \pm 0,094$ a $0,429 \pm 0,043$ días (4,54 a 10,3 horas) y una semivida en fase beta de $9,68 \pm 0,70$ a $14,5 \pm 1,7$ días. Entre las ratas que recibieron una dosis subcutánea de 1 mg/kg de AB7, los niveles séricos aumentaron hasta un máximo de $4,26 \pm 0,065$ µg/ml en 2-3 días, y declinaron con una semivida de $2,59 \pm 0,25$ días.

La farmacocinética también se evaluó en monos cangrejeros que recibieron el anticuerpo anti-IL-1 β como una inyección única de bolo intravenosa (IV). Para la dosis única de grupos de 0,3 y 3 mg/kg, los niveles de anticuerpo anti-IL-1 β en suero disminuyeron con una semivida promedio en fase alfa de $9,40 \pm 2,00$ horas, seguido de una semivida en fase beta de $13,3 \pm 1,0$ días (Figura 3). En los monos cangrejeros que recibieron una única inyección IV de 30 mg/kg, los niveles séricos de anticuerpos disminuyeron más rápidamente, con una semivida en fase alfa de $10,9 \pm 3,2$ horas, seguido de una semivida en fase beta de $7,54 \pm 1,79$ días. Un modelo de perfiles de la concentración plasmática-tiempo de dosis de 0,1, 0,3, 1 y 10 mg/kg administradas a intervalos de cinco meses, también se realizó y se muestra en la Figura 4.

Ejemplo 4

Inhibición de la producción de citocinas en sangre humana completa con un anticuerpo de IL-1 β .

La medición de citocinas en sangre durante una enfermedad o el tratamiento de una enfermedad puede ser útil para determinar la gravedad de la enfermedad o la respuesta a una terapia. Por lo general, los niveles de citocinas se miden en suero, pero este método no mide necesariamente las citocinas totales. Muchas citocinas pueden estar en el interior de las células (intracelular). Además, la capacidad de una célula para producir una citocina puede ser una información más útil que el nivel de citocinas circulantes.

Un método para estimular la sangre completa se utilizó para determinar la producción de citocinas y el efecto del tratamiento con un anticuerpo anti-IL-1 β . Se extrajo sangre de pacientes en tubos heparinizados estériles y luego 250 µl de la sangre completa se añadieron a cada criotubo estéril de 4 ml de Corning con tapón naranja, del modo siguiente:

Serie testigo

Todos los tubos se llenaron previamente con 550 µl de RPMI. Al tubo 1 (testigo), se añadieron 200 µl de RPMI y a los tubos 2-10, 100 µl de RPMI adicional. A cada uno de los tubos de 2 a 10, se añadieron 100 µl de diluciones de un anticuerpo anti-IL-1 β (AB7).

Serie del ensayo

Una serie similar de diluciones de anticuerpos se estableció tal y como se ha detallado anteriormente.

Todos los tubos se mezclaron bien utilizando un vórtice durante 10 segundos. Los tubos de la serie testigo A1-10 recibieron a continuación 100 µl adicionales de RPMI, se agitaron en vórtice durante 10 segundos, el tapón de rosca se cerró firmemente y los tubos se colocaron en la incubadora. Para la serie del ensayo, a los tubos B1-10, se añadieron 100 µl *Staphylococcus epidermidis* destruidas térmicamente (concentración final de 1:1000 de solución madre resultante en una relación de bacteria:glóbulo blanco de 10:1), los tubos se agitaron a continuación en vórtice durante 10 segundos, se taparon y se colocaron en una incubadora a 37°C. Después de 24 horas de incubación, todos los cultivos se lisaron con Triton X (0,5% final) para liberar los contenidos celulares y los lisados se congelaron. Después de la lisis de los cultivos de sangre completa, los tubos se sometieron a ciclos de congelación y descongelación, y se midieron los niveles de citocinas mediante ensayos de ELISA convencionales para citocinas para TNF α , IL-6, IFN γ , IL-8, IL-1 α , IL-1Ra e IL-1 β humanos (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Las citocinas medidas en los tubos de la serie testigo, que contienen sólo medio de cultivo estéril y anticuerpo (cuando se indica), reflejan el nivel espontáneo de la estimulación. En individuos sanos, se encontraron niveles muy bajos de las diversas citocinas cuando se miden después de 24 horas de incubación. En pacientes con enfermedades no tratadas, los niveles pueden ser más altos. La serie de tubos de ensayo contenía adicionalmente una cantidad definida de *Staphylococcus epidermidis* termodestruidos, que estimula la producción de una cantidad de citocinas. Si el tratamiento con anticuerpo anti-IL-1 β es eficaz, esto se reflejará por una producción reducida de citocinas.

Tal y como se muestra en la Figura 5, el anticuerpo AB7 de alta afinidad anti-IL-1 β fue muy eficaz en la inhibición de la producción de IL-1 β en la sangre humana. En un promedio de tres muestras de humanos, el anticuerpo inhibía la producción de IL-1 β inducida por *Staphylococcus epidermidis* en un 50% con 0,1 pM y en un 75% con 3 pM. Con 100 pM, la inhibición era del 100%. El interferón gamma (IFN γ) fue inducido por *Staphylococcus epidermidis* y AB7 reducía el IFN γ inducido por *Staphylococcus epidermidis* en un 75% con 100 pM.

Ejemplo 5

Farmacocinética de un anticuerpo anti-IL-1 β después de la administración a seres humanos.

La farmacocinética de un anticuerpo de IL-1 β que tiene las propiedades mencionadas anteriormente se demostró en un estudio clínico de fase I en humanos. Específicamente, se realizó un estudio clínico en humanos a doble ciego, controlado con placebo (en pacientes con diabetes de tipo 2) y los datos de cinco pacientes que recibieron anticuerpo de IL-1 β denominado AB7 (descrito anteriormente) con una dosis de 0,01 mg/kg a través de una infusión intravenosa a velocidad constante, se utilizaron para examinar la farmacocinética.

El Día 1 del estudio, el anticuerpo se administró a través de una infusión a velocidad constante durante 30 minutos por vía intravenosa. Las evaluaciones de la seguridad, incluyendo el registro de acontecimientos adversos, exámenes físicos, signos vitales, ensayos de laboratorio clínico (por ejemplo, química sanguínea, hematología, análisis de orina), los niveles plasmáticos de citocinas y electrocardiogramas (ECGs) se realizaron utilizando prácticas médicas convencionales, conocidas en la técnica. Las muestras de sangre se recogieron antes de la administración de la dosis y los días 0, 1, 2, 3, 4, 7, 9 \pm 1, 11 \pm 1, 14 \pm 1, 21 \pm 2, 28 \pm 2, 42 \pm 3, y 56 \pm 3 después de la administración, para evaluar los niveles de anticuerpo de IL-1 β (farmacocinética). El análisis preliminar de la farmacocinética del anticuerpo de IL-1 β en individuos que recibieron una sola dosis intravenosa de 0,01 mg/kg, mostraba perfiles de concentración sérica-tiempo con una semivida terminal de 22 días, aclaramiento de 2,9 ml/día/kg y volumen de distribución en el compartimento central de 50 ml/kg, muy similar al volumen de suero (Figura 6).

El análisis provisional de los datos farmacocinéticos después de la administración intravenosa de una dosis única de AB7 (XOMA 052) en individuos a través de los grupos de dosis de 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 o 1,0 mg/kg, confirmó además los perfiles de concentración sérica-tiempo con una semivida terminal de 22 días, aclaramiento de 2,54 ml/día/kg y volumen de distribución en el compartimento central de 41,3 ml/kg, muy similar al volumen de suero (Figura 7).

De manera similar, se analizaron muestras para los grupos de administración de dosis individuales SC. Tal y como se muestra en la Figura 2, la administración del anticuerpo con niveles de dosis de 0,03, 0,1 y 0,3 mg/kg produjeron perfiles con una semivida terminal de 22,7 días, aclaramiento de 2,4 ml/día/kg y volumen de distribución en el compartimento central de 40,7 ml/kg.

Ejemplo 6

Efectos de un anticuerpo de IL-1 β sobre CRP en individuos humanos.

La proteína C reactiva (CRP) también se midió en el suero en los mismos momentos de tiempo que las muestras de PK para determinar la actividad del anticuerpo en individuos humanos. Una sola dosis intravenosa de XOMA 052 reducía los niveles de proteína C reactiva ultrasensible (usCRP), una medida convencional de la inflamación sistémica asociada a múltiples patologías y un indicador del riesgo cardiaco, en todos los grupos de dosis tratados en comparación con el placebo. Tal y como se muestra en la Figura 8, a los 28 días después de una dosis única de XOMA 052, las reducciones de porcentaje medio en usCRP eran de 33, 46, 47, 36 y 26 para los grupos de dosis de 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 y 1,0 mg/kg, respectivamente, en comparación con el 4 por ciento para el placebo. La actividad resultante de una sola administración de anticuerpo con una dosis de 0,01 mg/kg, indica que se pueden utilizar incluso dosis menores.

Ejemplo 7

Protección contra la artritis inducida con colágeno en un modelo de AR en ratón.

Los anticuerpos o los fragmentos de IL-1 β que tienen las propiedades mencionadas anteriormente se pueden administrar a un individuo para el tratamiento terapéutico y/o la prevención de la AR. En concreto, en un ejemplo, un anticuerpo de IL-1 β , XOMA 052, fue sometido a ensayo para estudiar su capacidad para evitar la inducción de artritis inducida con colágeno (CIA), un modelo de artritis reumatoide en ratón. Ratones machos DBA/1 fueron tratados mediante inyección intraperitoneal con anticuerpo de isotipo testigo o XOMA 052, antes de la inducción de la enfermedad (día -1). Los anticuerpos se administraron dos veces por semana desde el día -1 hasta el final del estudio (7-8 semanas).

La enfermedad se indujo el día 0 en los ratones mediante inmunización subcutánea con 100 μ g de colágeno bovino de tipo II, emulsionado en adyuvante completo de Freund. El día 21, se administró una inmunización de refuerzo con 50 μ g de colágeno bovino de tipo II en adyuvante incompleto de Freund. El peso corporal y la progresión de la enfermedad se vigilaron dos veces por semana. Una puntuación de 0-4 de la enfermedad en cada pata se otorgó

siguiendo los criterios que figuran en la Tabla 2. A cada animal se le proporcionó un índice artrítico de 0-16 mediante la adición de la puntuación de la enfermedad de las cuatro patas.

Tabla 2
Puntuación de la enfermedad CIA

Puntuación	Definición
0	Pata normal, no artrítica
1	Eritema con inflamación limitado al empeine y/o implicación de uno o varios dedos
2	Eritema moderado e inflamación del empeine hasta la región tarsal y/o implicación de uno o varios dedos
3	Eritema sustancial e inflamación del empeine y la región tarsal y/o implicación de uno o varios dedos
4	Eritema grave e inflamación grave que incluye el empeine, la región tarsal y se extiende más allá (proximal) del tobillo y/o implicación de uno o varios dedos

5

XOMA 052 administrado a 1 mg/kg, 5 mg/kg y 15 mg/kg suprimía significativamente la enfermedad, tal y como se midió por el índice de artritis (Figura 9). La puntuación media de la artritis se moderó hasta el 67% en relación con el testigo de isotipo ($p < 0,05$, ANOVA seguida por el test de Tukey). XOMA 052 administrado a 0,3 mg/kg tuvo un efecto medible, pero no estadísticamente significativo, sobre la enfermedad. El día 52, en el que el índice medio de la artritis de los ratones testigos tratados con IgG2 es mayor que 10, XOMA 052 mejoró significativamente las puntuaciones de la enfermedad en un 66% con una dosis de 1, 5 y 15 mg/kg (Figura 10). Además de evitar la enfermedad empezando el día -1 (dosificación profiláctica), XOMA 052 también evita la artritis en CIA establecida (dosificación terapéutica). Cuando se retrasó la administración de XOMA 052 hasta el inicio de los síntomas, las puntuaciones de la enfermedad todavía se redujeron significativamente (Figura 11A, 11B).

10

La inflamación en la AR induce osteoclastogénesis y resorción ósea. Con el fin de evaluar el efecto de XOMA 052 sobre la patología ósea, se recogieron las patas traseras de los ratones al final del estudio profiláctico de CIA. Un análisis de las imágenes radiográficas mostraba que XOMA 052 podría evitar la erosión ósea y la proliferación ósea perióstica causada por la CIA (Figura 12). Las mismas patas fueron tratadas posteriormente, y las secciones se tiñeron con Hematoxilina-Floxina-Safran (HPS) o safranina O (Figura 13). Las patas de los ratones tratados con anticuerpo testigo de isotipo mostraron una infiltración inflamatoria masiva (Figura 13B) y la pérdida de cartílago (Figura 13E) en las articulaciones artríticas. Esto fue impedido en gran medida por el tratamiento con XOMA 052 (Figura 13C, 13F).

15

20

Ejemplo 8

Uso de un anticuerpo de IL-1 β en el tratamiento de la artritis reumatoide.

25

30

Los anticuerpos o fragmentos de IL-1 β que tienen las propiedades mencionadas anteriormente se pueden administrar a un individuo (por ejemplo, un paciente humano) para el tratamiento terapéutico y/o la prevención de la artritis reumatoide (AR). En concreto, en un ejemplo, un anticuerpo de IL-1 β , XOMA 052 (descrito anteriormente) se utiliza para el tratamiento terapéutico de pacientes que presenten signos y síntomas de AR. La seguridad y la eficacia del anticuerpo de IL-1 β para la AR se muestran en uno o varios estudios clínicos en humanos, incluyendo por ejemplo, los ensayos con el siguiente diseño en individuos con AR moderada o grave.

Un estudio a doble ciego, controlado con placebo, de dosis escalada de la seguridad y el PK de XOMA 052, se lleva a cabo en individuos con AR activa, estable, moderada a grave. Los individuos en grupos de dosis paralelos de seis individuos cada uno (varios grupos de fármacos activos y un grupo de placebo) están inscritos para recibir una sola infusión IV del fármaco en estudio (anticuerpo de IL-1 β o placebo) con los niveles de dosis que se muestran en la siguiente tabla.

35

Grupo de dosis	Número de individuos	Régimen de la dosis
A	6	Cuatro infusiones semanales IV de 0,03 mg/kg de anticuerpo
B	6	Cuatro infusiones semanales IV de 0,1 mg/kg de anticuerpo
C	6	Cuatro infusiones semanales IV de 0,3 mg/kg de anticuerpo
D	6	Cuatro infusiones semanales IV de 1,0 mg/kg de anticuerpo
E	6	Cuatro infusiones semanales IV de 3,0 mg/kg de anticuerpo
F	6	Cuatro infusiones semanales IV de placebo

Los individuos que cumplen todos los criterios de idoneidad están inscritos, distribuidos aleatoriamente en uno de los grupos de dosis y la dosis empieza el día 0 con el fármaco del estudio (anticuerpo o placebo). Por ejemplo, en un diseño de ensayo clínico, los individuos pueden estar incluidos si cumplen todos los criterios de diagnóstico ACR para AR, en los que deben estar presentes cuatro de los siete criterios siguientes:

40

- Rigidez matutina \geq 1 hora (presente un mínimo de 6 semanas).
- Artritis en tres o más de las siguientes articulaciones (presente un mínimo de 6 semanas): PIP derecha o izquierda, MCP, muñeca, codo, rodilla, tobillo, articulaciones MTP.
- Artritis de la muñeca, MCP, o articulación PIP (presente un mínimo de 6 semanas).

- 5
- Implicación simétrica de las articulaciones (presente un mínimo de 6 semanas).
 - Nódulos reumatoides sobre prominencias óseas o superficies extensoras o en regiones yuxtaarticulares.
 - Factor reumatoide sérico positivo.
 - Cambios radiográficos que incluyen erosiones o descalcificación ósea, localizados en las articulaciones afectadas o adyacentes a las mismas.

10 Además, los pacientes con enfermedad moderada a grave se definen del modo siguiente:

- Al menos seis articulaciones doloridas y seis articulaciones inflamadas (recuento de 28 articulaciones, véase Anexo 6), y
- ESR $>$ 28 mm/h o CRP $>$ 1,0 mg/dl.

15 Como alternativa, un estudio a doble ciego, controlado con placebo, de dosis escalada sobre la seguridad y la PK del anticuerpo, se lleva a cabo en individuos con AR activa, estable, moderada a grave (por ejemplo, similar al anterior). El estudio consta de dos partes.

20 En la Parte 1, nueve individuos (seis con fármaco activo y tres con placebo) reciben una sola dosis del fármaco en estudio, administrado por vía intravenosa (IV) a 0,3 mg/kg. En la Parte 2, los individuos en tres grupos de dosis con siete individuos cada uno (cinco con fármaco activo y dos con placebo) reciben cuatro infusiones intravenosas semanales del fármaco del estudio, con niveles de dosis determinados tras el examen de los datos de la Parte 1 del estudio y a partir de otros estudios de apoyo, tales como por ejemplo el anterior. La dosis inicial en la Parte 2 es menor que la dosis administrada en la Parte 1. Los regímenes de dosis para el estudio se resumen en la siguiente Tabla, y un estudio similar se puede realizar utilizando la administración SC de anticuerpo.

Grupos de dosis del estudio y regímenes

Parte	Grupo de dosis	Número de individuos	Régimen de la dosis
1	A	6 activos, 3 placebos	Una infusión única IV de 0,3 mg/kg
2	B	5 activos, 2 placebos	Cuatro infusiones IV a la semana con el menor de tres niveles de dosis, escogido después de revisar los datos de la Parte 1 del estudio y de dos estudios T2D en curso.
	C	5 activos, 2 placebos	Cuatro infusiones IV a la semana con el segundo nivel menor de tres niveles de dosis, escogido después de revisar los datos de la Parte 1 del estudio y de dos estudios T2D en curso
	D	5 activos, 2 placebos	Cuatro infusiones IV a la semana con el mayor de tres niveles de dosis (\leq 3 mg/kg), escogido después de revisar los datos de la Parte 1 del estudio y de dos estudios T2D en curso

25

Los individuos en un grupo de dosis única (Grupo A) están inscritos y reciben una dosis IV el día 0 y tienen evaluaciones de seguimiento realizadas hasta el día 56. La seguridad se evaluó mediante mediciones seriadas antes y después del tratamiento, de los signos vitales, determinaciones de laboratorio clínico y el registro de eventos clínicos adversos. Los datos de PK se recogieron y analizaron en momentos periódicos. Después de que el último individuo en el grupo de dosis A ha completado los procedimientos del estudio hasta el día 28, si no más de un individuo, que recibe XOMA 052 en el grupo de dosis A, ha experimentado una toxicidad limitante de la dosis (DLT) y el DSMB no ve ningún problema de seguridad clínicamente significativo, el DSMB recomendará tres dosis IV en aumento para uso en la Parte 2 del estudio y la inscripción puede comenzar.

30

Los individuos en los grupos de dosis múltiples (por ejemplo, grupos de dosis B, C y D) reciben cuatro infusiones intravenosas semanales de XOMA 052 en uno de los tres niveles de dosis sucesivamente mayores. El seguimiento procede como en la Parte 1, excepto que, antes del aumento a la siguiente dosis más alta, los individuos en un grupo de dosis deben completar los procedimientos del estudio hasta el día 35 o el día 49, dependiendo, respectivamente, de si ningún individuo o un individuo en un grupo de dosis, que haya experimentado una toxicidad limitante de la dosis (DLT). Todos los individuos en los grupos de dosis múltiples tendrán evaluaciones de seguimiento realizadas hasta el día 77. Como con la Parte 1, la seguridad se evalúa mediante mediciones en serie,

antes y después del tratamiento de los signos vitales, evaluaciones clínicas de laboratorio y el registro de eventos clínicos adversos. Los datos de PK se recogieron y se analizaron en diversos momentos.

5 Para evaluar la actividad biológica del tratamiento con el anticuerpo en individuos con AR, se miden CRP y ESR como marcadores de la inflamación y los criterios esenciales de respuesta según la norma aceptada médicamente del Colegio Americano de Reumatología (ACR), se utilizan como un medio para medir el estado de la enfermedad después del tratamiento. Las determinaciones de los criterios esenciales de ACR se llevan a cabo en la selección y los días 0 (previo a la dosis), 7, 14, 21, 28, 42 y 56.

Los criterios esenciales de ACR para evaluar el estado de la enfermedad AR, incluyen las siguientes evaluaciones:

- Recuento de articulaciones dolorosas (28 articulaciones)
- 10 - Recuento de articulaciones inflamadas (28 articulaciones)
- Evaluación del dolor en el Individuo
- Evaluación global del individuo
- Evaluación global del médico
- Discapacidad autoevaluada por el individuo según PROMIS HAQ®
- 15 - Reactivo de fase aguda (ESR/CRP)

El recuento de articulaciones dolorosas y el recuento de articulaciones inflamadas se basan en el índice estándar de 28 articulaciones de Fuchs. La evaluación del dolor del individuo, la evaluación global del individuo y la evaluación global del médico emplean una escala analógica visual de 100 mm. El PROMIS HAQ® es un cuestionario aceptado de evaluación de la salud. Los reactivos de fase aguda (ESR y CRP) se evalúan en cada visita del estudio, comenzando el día 0.

20 Los componentes de los criterios esenciales ACR se analizan usando los criterios convencionales de respuesta ACR (es decir, ACR20, ACR50 y ACR70) y DAS28-CRP. El calculador 28 de DAS ("Disease Activity Score") es una abreviatura validada del modelo de cálculo original de DAS, utilizado para medir la gravedad y la actividad de la artritis reumatoide. El estudio puede usar una versión del DAS 28 (DAS28-CRP), que incorpora en el cálculo los resultados de CRP en lugar de los resultados de ESR. El DAS28-CRP se basa en las puntuaciones ponderadas de las cuatro variables siguientes:

- (TEN28): Número de articulaciones dolorosas de 28 articulaciones
- (SW28): Número de articulaciones inflamadas de 28 articulaciones
- (CRP): medición de CRP en mg/L
- 30 - (GH): evaluación global en el individuo de la actividad de la enfermedad en una escala analógica visual de 100 mm (VAS).

35 Para determinar la actividad de la enfermedad por el método DAS28-CRP, el médico determina el número de articulaciones dolorosas y/o inflamadas utilizando el índice de 28 articulaciones de Fuchs (véase el anexo 6). Los niveles de CRP se determinaron mediante una prueba de laboratorio. El estado general de la enfermedad en el individuo se evalúa utilizando una VAS de 100 mm. Los resultados de estas pruebas se introducen a continuación en la ecuación siguiente:

$$0,56*\sqrt{TEN28} + 0,28*\sqrt{SW28} + 0,36*Ln(CRP + 1) + 0,014*GH + 0,96$$

en donde:

Sqrt = raíz cuadrada

40 *TEN28 = número de articulaciones dolorosas*

SW28 = número de articulaciones inflamadas

Ln = logaritmo natural

CRP = medición de CRP en mg/L

GH = evaluación global en el individuo de la actividad de la enfermedad con una VAS de 100 mm

45 Fuente: Ecuaciones de http://www.das-score.nl/www.das-score.nl/DAS_CRP.html

Los resultados de DAS28-CRP van desde 1 a 10, indicando una puntuación inferior a 2,6 la remisión, representando las puntuaciones entre 2,6 y 3,2 un nivel bajo de actividad de la enfermedad e indicando las puntuaciones superiores a 5,1 una actividad elevada de la enfermedad.

5 Además, se recogieron muestras de sangre completa y se analizó la presencia de citocinas que pueden incluir, pero no se limitan a, TNF α , IL-6, IFN γ , IL-8 e IL-1 α

10 Los datos provisionales de tres individuos, dos que recibían 0,3 mg/kg de anticuerpo y uno que recibió placebo, mostraron una mejora duradera y consistente en los reactivos de fase aguda (por ejemplo, CRP) en los individuos tratados con anticuerpo, mientras que el individuo tratado con placebo no mejoró. Además, ambos individuos tratados con anticuerpo mostraron una evidencia del efecto del tratamiento según los criterios de puntuación ACR, cumpliendo un individuo los criterios ACR70 en los últimos momentos.

15 Basándose en los resultados obtenidos a partir del primer estudio clínico, se pueden realizar ensayos clínicos adicionales. Tales ensayos pueden incluir una o varias de las dosificaciones y regímenes de dosificación mencionados anteriormente, así como, o alternativamente, una o varias otras dosificaciones de anticuerpo de IL-1 β , vías alternativas de administración, tratamiento más largo y/o períodos de observación y mayor cantidad de pacientes por grupo (por ejemplo, al menos aproximadamente 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000).

Todas las referencias, incluidas las publicaciones, documentos de solicitudes de patente y patentes, citadas en esta memoria se incorporan en este documento como referencia, igualmente como si cada referencia se indicara individual y específicamente para ser incorporada como referencia y se expusiera en su totalidad en esta memoria.

20 El uso de los términos "un" y "una" y "el" "la" y términos similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se ha de interpretar como que incluye tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en este documento o esté en clara contradicción con el contexto. Las expresiones "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" deben interpretarse como expresiones abiertas (es decir, que significan "que incluye, pero no limitado a,") a menos que se indique lo contrario. Dondequiera que un término indefinido se utilice para describir una característica o un elemento de la invención, se contempla específicamente que un término definido se pueda utilizar en lugar del término indefinido, sin apartarse del espíritu y del alcance de la invención. La citación de intervalos de valores en esta memoria, tiene meramente la intención de servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor independiente que cae dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en este documento, y cada valor independiente se incorpora en la memoria descriptiva como si se citara individualmente en la presente memoria. Todos los métodos descritos en la presente memoria se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en este documento o de otra manera, en clara contradicción con el contexto. El uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o la expresión ejemplar (por ejemplo, "tal como") proporcionados en este documento, está destinado únicamente a esclarecer mejor la invención y no plantea una limitación en el alcance de la invención a menos que se reivindique de otro modo. Ninguna expresión en la memoria descriptiva debe interpretarse como una indicación de que cualquier elemento no reivindicado sea esencial para la puesta en práctica de la invención.

35 Las realizaciones preferidas de esta invención se describen en la presente memoria, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Variaciones de estas realizaciones preferidas pueden resultar evidentes para los que trabajan en la técnica, después de leer la descripción anterior. Los inventores esperan que los expertos en la materia empleen tales variaciones de modo apropiado.

40

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> XOMA Technology Ltd.
 <120> Métodos para el tratamiento de la artritis reumatoide
 <130> 117791-151
 10 <150> US 61/059,711
 <151> 06-06-2008
 <160> 6
 15 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 23
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Epítipo - sintetizado
 25 <400> 1
 Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys Met Glu Lys Arg
 1 5 10 15

 Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu
 20
 <210> 2
 <211> 5
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Enlazador - sintetizado
 35 <400> 2
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 3
 <211> 107
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Región variable de la cadena ligera de AB5 - sintetizado
 45 <400> 3
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

ES 2 398 693 T3

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln Gly Lys Met Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 4

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena pesada de AB5 - sintetizado

10 <400> 4

ES 2 398 693 T3

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

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

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Thr Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
 65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
 85 90 95

Cys Ala Arg Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Región variable de la cadena ligera de AB7 - sintetizado

<400> 5

ES 2 398 693 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Gln
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln Gly Lys Met Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 6
 <211> 120
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 10 <223> Región variable de la cadena pesada de AB7 - sintetizado

<400> 6

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

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

ES 2 398 693 T3

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe
 85 90 95

Cys Ala Arg Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-IL-1 β o un fragmento del mismo, para uso en el tratamiento de la artritis reumatoide, en donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se une a IL-1 β humana con una constante de disociación de 1 pM o menor, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo compete en la unión con un anticuerpo que tiene la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 6, en donde la administración de una dosis inicial del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo está seguida por la administración de una o varias dosis posteriores, en donde la dosis inicial y cada una de las dosis posteriores se administran en un intervalo desde una vez a la semana hasta una vez cada seis meses y en donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se va a administrar con una dosis de al menos 0,01 mg/kg a 1 mg/kg de anticuerpo o de fragmento de anticuerpo.
2. Composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o el fragmento se va a administrar como una dosis fija, independientemente de una relación entre dosis y peso del individuo.
3. Composición farmacéutica para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en donde el anticuerpo o el fragmento anti-IL-1 β se va a administrar mediante inyección subcutánea, intravenosa o intramuscular.
4. Composición farmacéutica para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en donde la administración de dicha dosis o varias dosis posteriores se efectúa en una cantidad de dosis que es la misma, inferior o superior a la dosis inicial.
5. Composición farmacéutica para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, en donde la dosis del anticuerpo o del fragmento es suficiente para conseguir una mejora en uno o varios de los criterios esenciales de respuesta ACR.
6. Composición farmacéutica para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, en donde la dosis del anticuerpo o del fragmento es suficiente para conseguir al menos un 20% de mejora en la puntuación de ACR 50.
7. Composición farmacéutica para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 5-6, en donde la mejora es de 3 meses o más.
8. Composición farmacéutica para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en donde la dosis de anticuerpo o de fragmento es suficiente para conseguir una disminución de la infiltración inflamatoria.
9. Composición farmacéutica para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en donde la dosis de anticuerpo o de fragmento es suficiente para conseguir una disminución de la pérdida de cartílago.
10. Composición farmacéutica para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en donde la dosis de anticuerpo o de fragmento es suficiente para conseguir una disminución de la resorción ósea.
11. Composición farmacéutica para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en donde la dosis del anticuerpo o del fragmento es suficiente para conseguir una mejora en la puntuación radiográfica.
12. Composición farmacéutica para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-11, en donde la dosis del anticuerpo o del fragmento es suficiente para conseguir al menos una disminución del 20% en los niveles de CRP.
13. Composición farmacéutica para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-11, en donde la dosis del anticuerpo o del fragmento es suficiente para conseguir al menos una disminución del 20% en ESR.
14. Composición farmacéutica para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-11, en donde la dosis del anticuerpo o del fragmento es suficiente para conseguir al menos una disminución del 20% en CRP y al menos una disminución del 20% en ESR.
15. Composición farmacéutica para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-14, en donde dicho método está asociado con al menos un método de tratamiento adicional, comprendiendo dicho método de tratamiento adicional administrar al menos una composición farmacéutica que comprende un agente activo distinto de un anticuerpo o un fragmento de IL-1 β .
16. Composición farmacéutica para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo comprende una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 6.

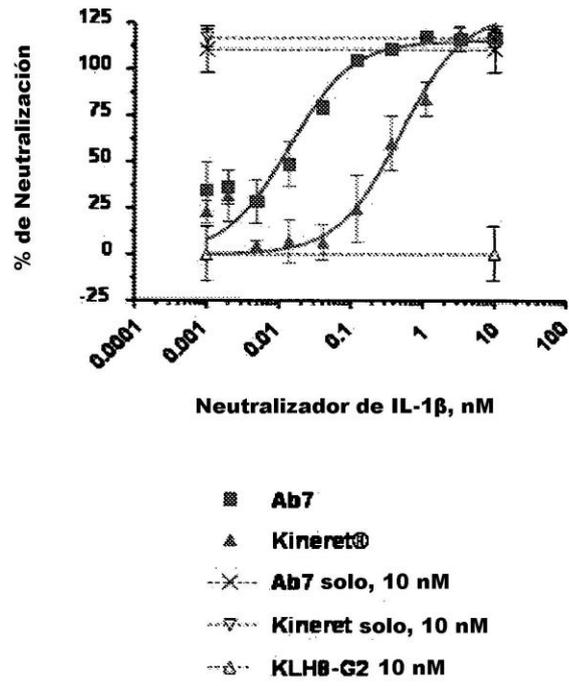


Figura 1

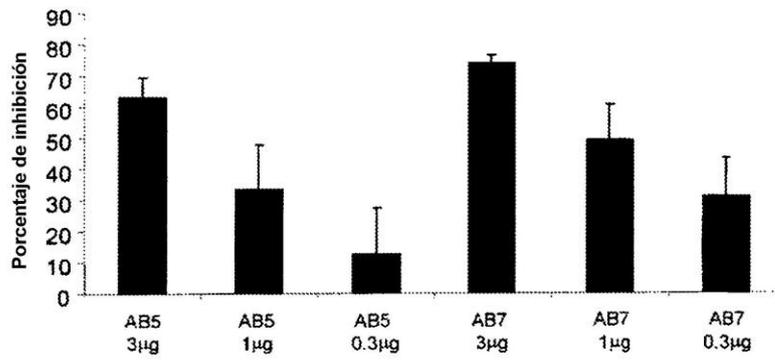


Figura 2

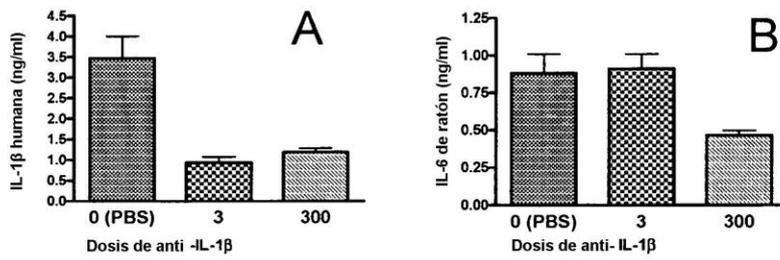


Figura 2B

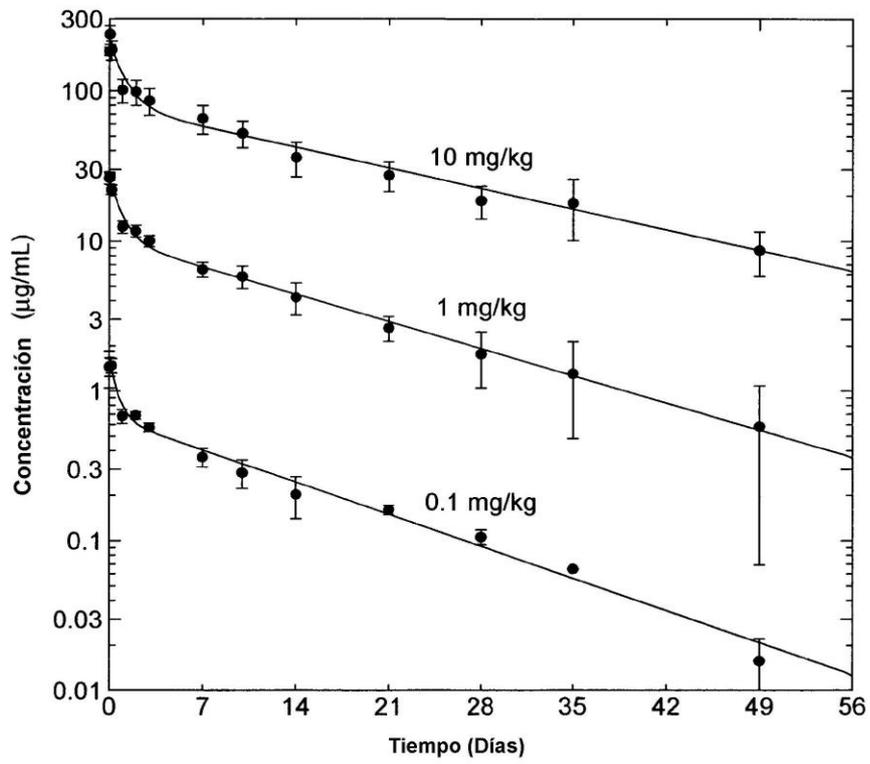


Figura 3

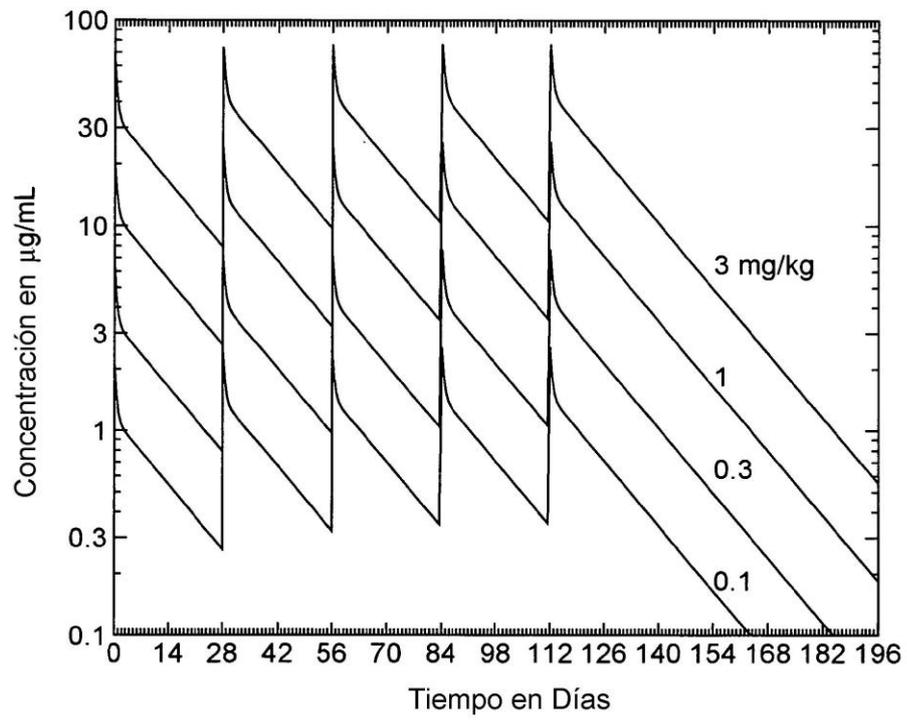


Figura 4

Estimulante	Ab	IL-1 β	IL-1a	IL-6	IL-8	IL-1Ra	TNF α	IFN γ
RPMI	0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	1.1
RPMI	10000	0.0	0.0	0.0	13.4	22.0	0.0	0.8
Staph	10000	0.0	31.7	45.6	93.6	79.7	52.6	22.1
Staph	1000	0.0	30.7	49.4	85.9	94.8	74.0	26.7
Staph	100	0.9	40.8	74.1	97.1	92.6	69.5	34.9
Staph	10	18.4	46.9	80.4	97.9	93.3	94.9	36.9
Staph	3	23.8	41.1	71.3	93.7	101.2	97.3	43.8
Staph	1	26.4	49.6	69.8	98.0	95.7	96.1	48.7
Staph	0.1	56.1	63.3	75.1	103.6	102.5	101.0	54.8
Staph	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

Figura 5

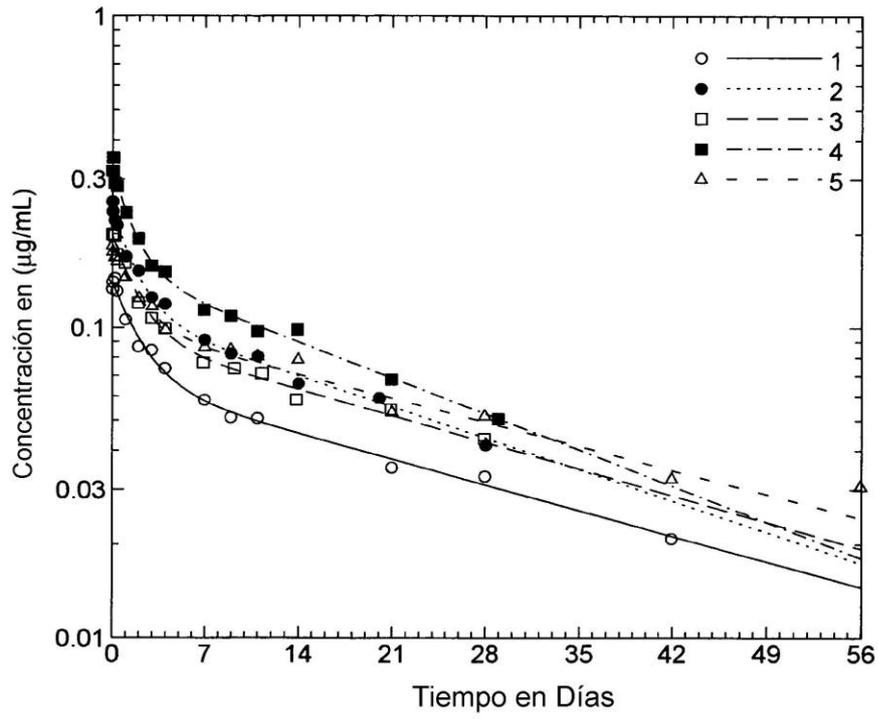
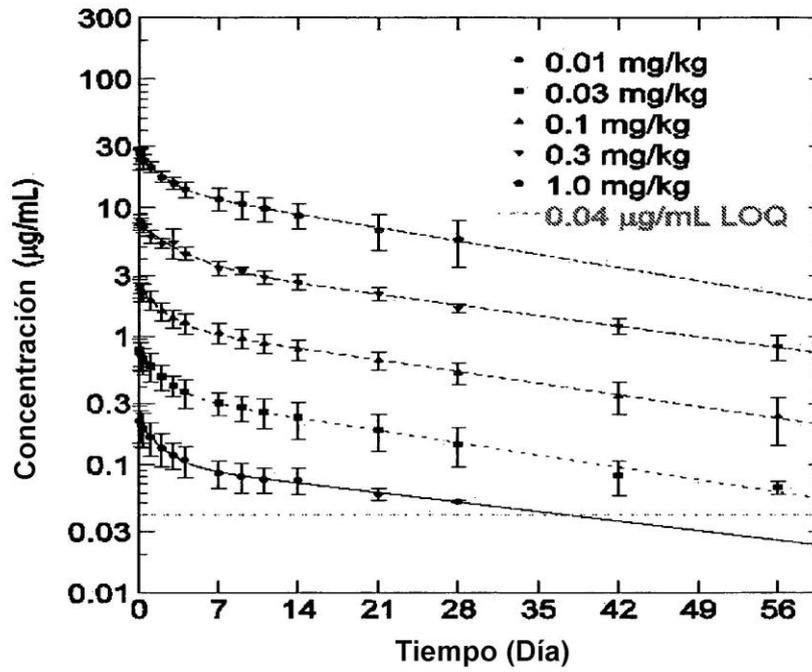


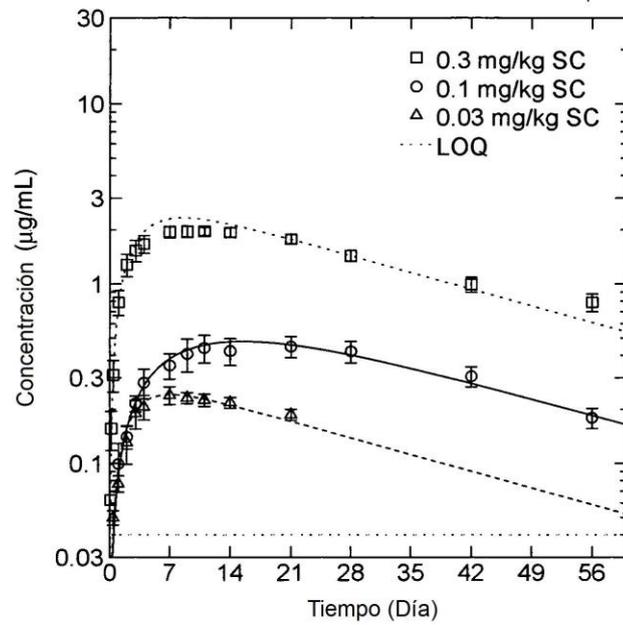
Figura 6



$T_{\alpha} = 1.42$ días
 $T_{\beta} = 22.0$ días
 $CL = 2.54$ mL/día/kg
 $V_c = 41.3$ mL/kg
 $F_{\alpha} = 0.061$

LOQ = Limite de la cuantificación

Figura 7A



$T_{\alpha} = 1.6$ días
 $T_{\beta} = 22.7$ días
 $CL = 2.4$ mL/día/kg
 $V_c = 40.7$ mL/kg
 $F_{\alpha} = 0.068$

LOQ = Límite de Cuantificación

Figura 7B

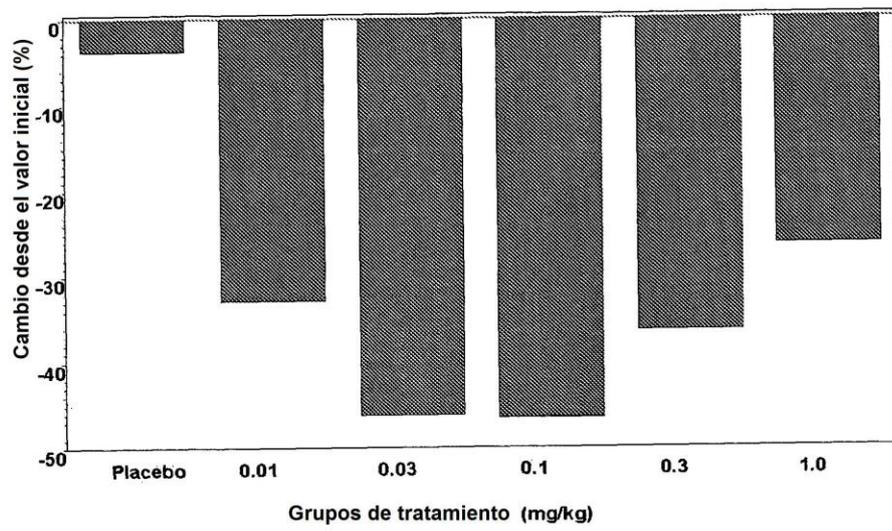


Figura 8

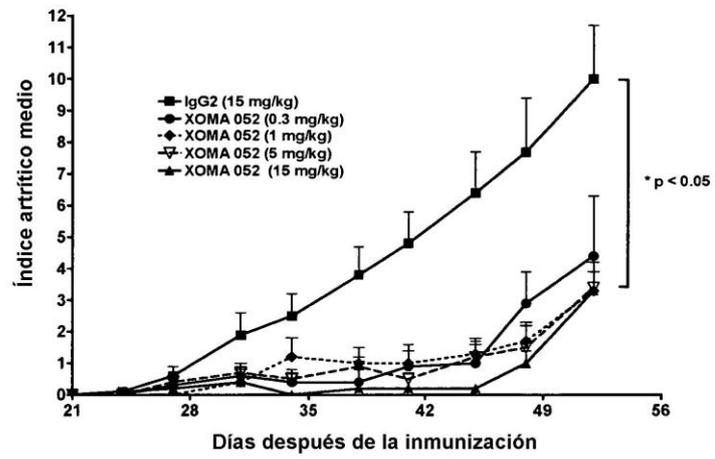


Figura 9

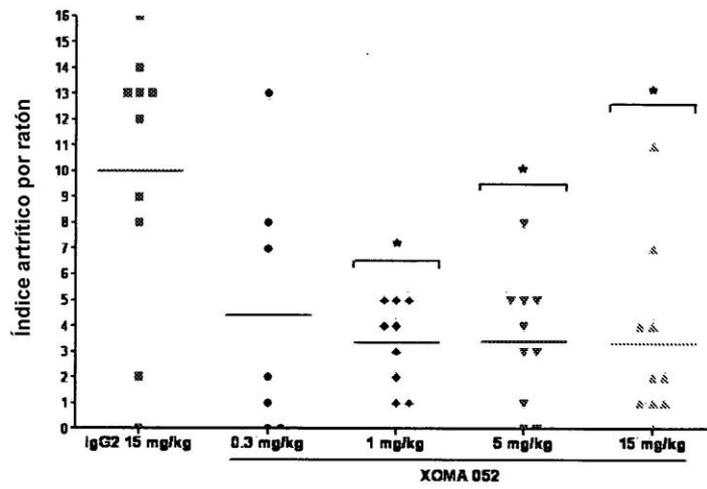


Figura 10

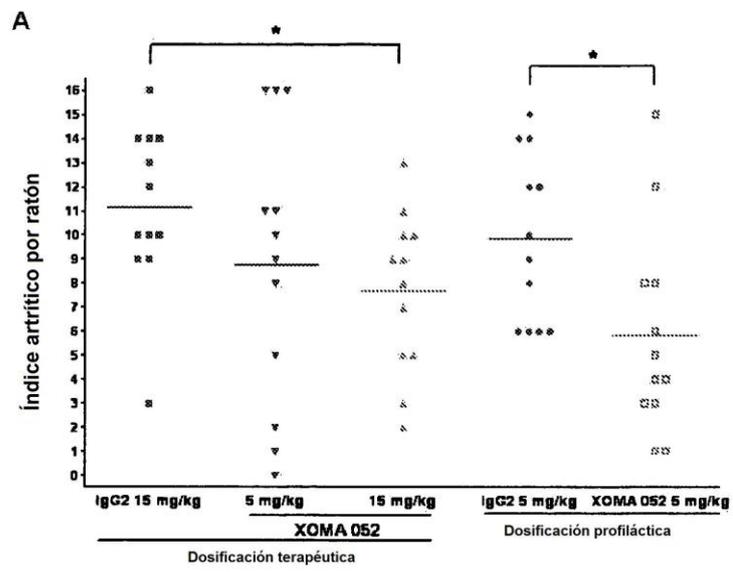


Figura 11A

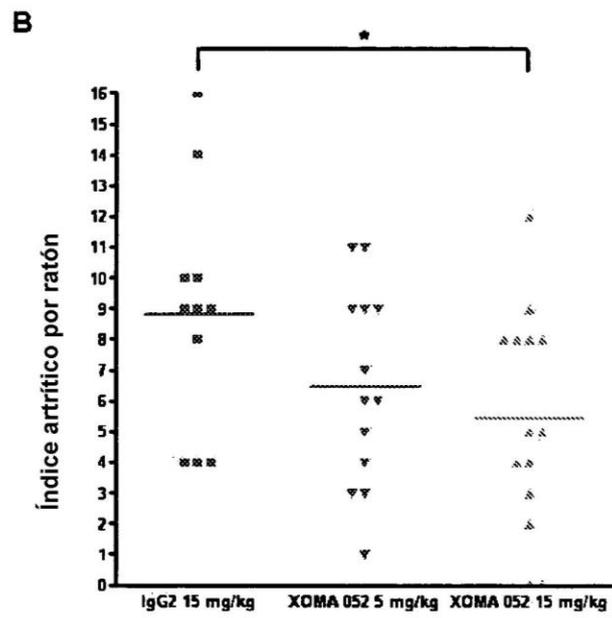


Figura 11B

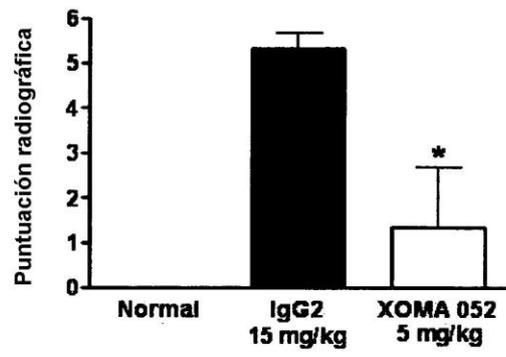


Figura 12

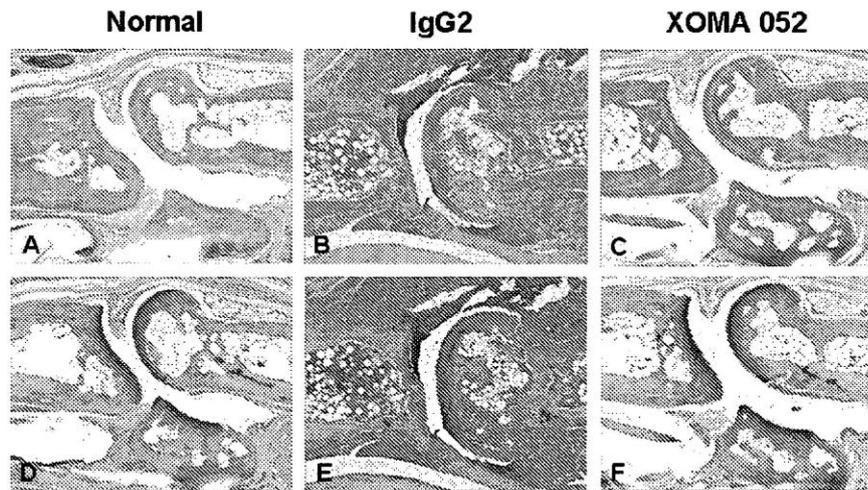


Figura 13