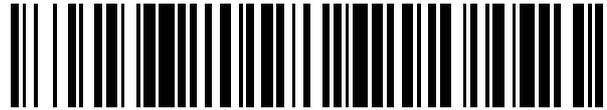


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 326**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2008 E 08866346 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.10.2014 EP 2391650**

54 Título: **Métodos para el tratamiento de la gota**

30 Prioridad:

20.12.2007 US 15633 P

06.06.2008 US 59378 P

08.09.2008 US 95191 P

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

22.01.2015

73 Titular/es:

XOMA (US) LLC (100.0%)

2910 Seventh Street

Berkeley, CA 94710, US

72 Inventor/es:

SOLINGER, ALAN M.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 527 326 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 gota

Campo de la invención

5 La invención se refiere a anticuerpos IL-1 β y fragmentos de éstos para uso en el tratamiento y/o prevención de la gota. Dichos anticuerpos o fragmentos pueden usarse para tratar a un sujeto que padece gota o para prevenir la aparición de la misma en un sujeto en riesgo.

Antecedentes de la invención

10 La presente descripción está dirigida a anticuerpos IL-1 β y fragmentos de éstos para uso en el tratamiento y/o prevención de la gota en un sujeto. Dichos anticuerpos o fragmentos pueden usarse para tratar a un sujeto mamífero (por ejemplo, un ser humano) que padece gota o para prevenir la aparición de la misma en un sujeto en riesgo.

15 La gota es una forma de artritis aguda que causa dolor severo e hinchazón en las articulaciones. La artritis gotosa fue responsable de 3,9 millones de visitas ambulatorias estimadas en los Estados Unidos en 2002. A diferencia de otras enfermedades reumáticas, la etiología de la gota está bien caracterizada, su patofisiología se comprende bien, y la enfermedad se diagnostica fácilmente. Para muchos pacientes, la terapia con fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAID) o corticosteroides para los ataques agudos y la prevención de la recurrencia con agentes que disminuyen los niveles séricos de ácido úrico son altamente eficaces. Sin embargo, estas terapias no son suficientes para muchos pacientes con gota aguda, crónica o refractaria debido a la ausencia de eficacia clínica adecuada, toxicidades asociadas, o debido a enfermedades co-mórbidas.

20 La gota es la precipitación de cristales en el tejido, habitualmente en y alrededor de las articulaciones, causando lo más frecuentemente artritis aguda o crónica.

25 La enfermedad está marcada por depósitos de cristales de urato monosódico (MSU) en el tejido, habitualmente en y alrededor de las articulaciones y en el fluido y recubrimiento sinovial, y habitualmente una cantidad excesiva de ácido úrico en la sangre. Se produce una inflamación intensa de las articulaciones al engullir las células blancas de la sangre los cristales de ácido úrico, causando dolor, calor, y enrojecimiento de los tejidos articulares. La artritis gotosa se debe a la liberación inducida por el cristal de urato monosódico de citoquinas proinflamatorias de los leucocitos. Entre las muchas citoquinas implicadas, IL-1 puede tener un papel especial en la red inflamatoria, ya que los cristales de MSU estimulan la liberación de IL-1 por los monocitos y células mononucleares sinoviales. Los ataques de gota aguda aparecen habitualmente de repente, desaparecen después de 5 a 10 días, y pueden seguir recurriendo.

30 IL-1 β es una citoquina pro-inflamatoria secretada por varios tipos celulares diferentes incluyendo monocitos y macrófagos. Cuando se libera como parte de una reacción inflamatoria, IL-1 β produce un rango de efectos biológicos, principalmente mediados a través de la inducción de otros mediadores inflamatorios tales como corticotrofina, factor 4 de plaquetas, prostaglandina E2 (PGE2), IL-6, e IL-8. IL-1 β induce efectos inflamatorios tanto locales como sistémicos a través de la activación del receptor de IL-1 encontrado en casi todos los tipos celulares.
35 La familia de citoquinas interleuquina-1 (IL-1) se ha implicado en varios estados patológicos. Los miembros de la familia IL-1 incluyen IL-1 α , IL-1 β , e IL-1Ra. Aunque están relacionadas por su capacidad de unirse a los receptor IL-1 (IL-1R1 e IL-1R2), cada una de estas citoquinas es diferente, expresándose por un gen diferente y teniendo una secuencia de aminoácidos primaria diferente. Además, las actividades fisiológicas de estas citoquinas pueden distinguirse entre sí.

40 Se han publicado experimentos que indican la implicación aparente de IL-1 β y otros mediadores inflamatorios en la gota (véase, por ejemplo, Petrilli et al., *Joint Bone Spine* (2007) 74:571-576; Pope et al., *Arthritis Rheum.* (2007) 56:3183-3188; Chen et al., *J. Clin. Invest.* (2006) 116:2073-2075; Akahoshi, T., et al., *Curr. Opin. Rheumatol.* (2007) 19:146-150; Martinon, F., et al., *Nature* (2006) 440:237-241; y Cronstein et al., *Arthritis Res. Ther.* (2006) 8, Supl. 1:S3). So et al., *Arthritis Res. Ther.* (2007) 9(2):R28 describen el uso de un antagonista del receptor IL-1 recombinante (IL-1Ra, anakinra) en un estudio abierto para el tratamiento de gota aguda, realizado con dosificación diaria de 100 mg subcutáneamente durante 3 días. McGonagle, et al., *Ann. Rheum. Dis.* (2007) 66:1683-1684 describen el uso de un antagonista del receptor IL-1 recombinante (IL-1Ra, anakinra) para el tratamiento de gota en un paciente que recibe dosis subcutáneas diarias continuas de 100 mg. La dosificación diaria de medicaciones inyectables es generalmente indeseable y puede resultar en problemas con el seguimiento de los pacientes, disminuyendo de esta manera la eficacia de esta modalidad de tratamiento o limitando su idoneidad. Así, permanece una necesidad de medios eficaces para tratar la gota, particularmente composiciones y métodos de tratamiento que no requieran inyecciones frecuentes (por ejemplo, diarias).

WO 2007/077261 A1 describe inhibidores del inflammasoma NALP3 para uso en el tratamiento de la gota.

WO 2007/002261 A1 describe entre otros anticuerpos específicos de IL-1 β .

55 WO03/010282 A1 describe entre otros anticuerpos específicos de IL-1 β .

WO 2008/077145 A2 describe anticuerpos IL-1 β de éste entre otros para uso en el tratamiento de la Diabetes de Tipo 2.

Simon et al., Journal of Biological Chemistry (1993), 268(13), 9771-9779 describen el mapeo de epítomos neutralizantes de anticuerpos IL-1 β .

5 Dinarello et al., Current Opinion in Pharmacology (2004), 4(4), 378-385, describen estrategias terapéuticas para reducir la actividad de IL-1 en el tratamiento de inflamación local y sistémica usando moléculas trampa de IL-1 β .

Pope et al., Arthritis & Rheumatism (2007), 56 (10), 3183-3188 describen el papel de interleuquina-1 y el inflammasoma en la gota.

10 Nishimura et al., Journal of Leukocyte Biology (1997), 62 (4), 444-449, describen anticuerpos de Interleuquina 8 para uso en el tratamiento de la gota.

Debido a los problemas con los tratamientos actuales, se necesitan nuevas terapias para tratar la gota para reemplazar o complementar las estrategias farmacéuticas disponibles. La presente descripción proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de la gota (por ejemplo, gota aguda, gota crónica, gota refractaria). Los métodos descritos en la presente memoria comprenden, por ejemplo, administrar un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste. Los métodos que están dirigidos directamente al ligando IL-1 β con un anticuerpo, particularmente anticuerpos que presentan alta afinidad, proporcionan ventajas sobre otros métodos de tratamiento potenciales, tales como antagonistas del receptor de IL-1 β (por ejemplo, IL-1Ra, Anakinra). El reto para los terapéuticos basados en antagonista del receptor IL-1 es la necesidad de que dichos terapéuticos ocupen un gran número de receptores, lo que es una tarea formidable ya que estos receptores están expresados ampliamente en todas las células excepto las células rojas de la sangre (Dinarello, Curr. Opin. Pharmacol. 4: 378-385, 2004). En la mayor parte de las enfermedades mediadas por inmunidad, tales como las enfermedades descritas en la presente memoria, la cantidad de citoquina IL-1 β que es mensurable en los fluidos corporales o asociada con células activadas es relativamente baja. Así, un método para el tratamiento y/o prevención que está dirigido directamente al ligando IL-1 β proporcionaría una estrategia superior, particularmente cuando se administra un anticuerpo IL-1 β con alta afinidad.

25 Resumen de la invención

La presente descripción está dirigida a un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste para uso en el tratamiento y/o prevención de la gota en un sujeto, en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6. Dichos anticuerpos o fragmentos de éstos pueden usarse para tratar a un sujeto mamífero (por ejemplo, un ser humano) que padece o tiene riesgo de gota. Los anticuerpos o fragmentos de éstos también pueden usarse para prevenir la aparición de gota en un sujeto en riesgo.

En una realización de la descripción, la gota es gota crónica. En otra realización, la gota es gota aguda. En otra realización más, la gota es gota refractaria.

35 En otro aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste para uso en el tratamiento de la gota en un sujeto (por ejemplo, sujeto humano), en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, comprendiendo el uso administrar (por ejemplo, en una cantidad terapéuticamente eficaz) el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste al sujeto, en el que la dosis del anticuerpo o fragmento es suficiente para conseguir al menos una reducción del 50% en el dolor articular. En una realización, el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste es suficiente para conseguir al menos una reducción del 60% en el dolor articular, al menos una reducción del 70% en el dolor articular, al menos una reducción del 80% en el dolor articular, al menos una reducción del 90% en el dolor articular, al menos una reducción del 95% en el dolor articular o una reducción del 100% en el dolor articular.

45 En otro aspecto de la descripción, la dosis del anticuerpo o fragmento es suficiente para conseguir al menos una disminución del 20% en los niveles de la proteína C reactiva (CRP), al menos una disminución del 30% en los niveles de CRP, al menos una disminución del 40% en los niveles de CRP, al menos una disminución del 50% en los niveles de CRP, al menos una disminución del 60% en los niveles de CRP, al menos una disminución del 70% en los niveles de CRP, al menos una disminución del 80% en los niveles de CRP, al menos una disminución del 90% en los niveles de CRP. En una realización preferida, la dosis del anticuerpo o fragmento es suficiente para conseguir al menos una reducción del 50% en el dolor articular y al menos una disminución del 20% en los niveles de CRP, al menos una disminución del 30% en los niveles de CRP, al menos una disminución del 40% en los niveles de CRP, al menos una disminución del 50% en los niveles de CRP, al menos una disminución del 60% en los niveles de CRP, al menos una disminución del 70% en los niveles de CRP, al menos una disminución del 80% en los niveles de CRP y/o al menos una disminución del 90% en los niveles de CRP.

55 En otro aspecto de la descripción, la dosis del anticuerpo o fragmento es suficiente para conseguir al menos una disminución del 20% en la Velocidad de Sedimentación de Eritrocitos (ESR), al menos una disminución del 40% en ESR, al menos una disminución del 50% en ESR, al menos una disminución del 60% en ESR, al menos una disminución del 70% en ESR, al menos una disminución del 80% en ESR, al menos una disminución del 90% en

ESR. En una realización preferida, la dosis del anticuerpo o fragmento es suficiente para conseguir al menos una reducción del 50% en el dolor articular y al menos una disminución del 20% en ESR, al menos una disminución del 40% en ESR, al menos una disminución del 50% en ESR, al menos una disminución del 60% en ESR, al menos una disminución del 70% en ESR, al menos una disminución del 80% en ESR y/o al menos una disminución del 90% en ESR.

En otro aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste para uso en el tratamiento de la gota en un sujeto (por ejemplo, sujeto humano), en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, comprendiendo el uso administrar (por ejemplo, en una cantidad terapéuticamente eficaz) el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste al sujeto, en el que la dosis del anticuerpo o fragmento es suficiente para conseguir al menos una reducción del 50% en el dolor articular, al menos una disminución del 20% en los niveles de CRP y al menos una disminución del 20% en ESR. En una realización, la dosis del anticuerpo o fragmento es suficiente para conseguir al menos una reducción del 50% en el dolor articular, al menos una disminución del 30% en los niveles de CRP y una disminución del 30% en ESR. En otra realización, la dosis del anticuerpo o fragmento es suficiente para conseguir al menos una reducción del 50% en el dolor articular, al menos una disminución del 40% en los niveles de CRP y una disminución del 40% en ESR. En otra realización, la dosis del anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento es suficiente para conseguir al menos una reducción del 60% en el dolor articular, al menos una disminución del 20% en los niveles de CRP y al menos una disminución del 20% en ESR. En otra realización, la dosis del anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento es suficiente para conseguir al menos una reducción del 60% en el dolor articular, al menos una disminución del 40% en los niveles de CRP y al menos una disminución del 40% en ESR. En otra realización, la dosis del anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento es suficiente para conseguir al menos una reducción del 60% en el dolor articular, al menos una disminución del 50% en los niveles de CRP y al menos una disminución del 50% en ESR. En otra realización más, la dosis del anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento es suficiente para conseguir al menos una reducción del 70% en el dolor articular, al menos una disminución del 20% en los niveles de CRP y al menos una disminución del 20% en ESR. En otra realización, la dosis del anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento es suficiente para conseguir al menos una reducción del 70% en el dolor articular, al menos una disminución del 40% en los niveles de CRP y al menos una disminución del 40% en ESR. En otra realización, la dosis del anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento es suficiente para conseguir al menos una reducción del 70% en el dolor articular, al menos una disminución del 50% en los niveles de CRP y al menos una disminución del 50% en ESR.

Los anticuerpos anti-IL-1 β o fragmentos de anticuerpo para uso en los métodos descritos en la presente memoria se unen generalmente a IL-1 β con alta afinidad. En una realización preferida, la descripción proporciona un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste para uso en el tratamiento de la gota en un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano), en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, comprendiendo el uso administrar (por ejemplo, en una cantidad terapéuticamente eficaz) el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste al sujeto, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a IL-1 β con una constante de disociación de aproximadamente 1 pM o menor.

En otro aspecto de la descripción, el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo neutralizante. En otro aspecto de la descripción, el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de anticuerpo se une a un epítipo de IL-1 β de manera que el anticuerpo o fragmento unido permite sustancialmente la unión de IL-1 β al receptor IL-1 (IL-1R1). En otro aspecto de la descripción, el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de anticuerpo se une a IL-1 β , pero no evita sustancialmente que el IL-1 β unido se una al receptor IL-1 (IL-1R1). En otro aspecto de la descripción, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo no se une de manera detectable a IL-1 α , IL-1R o IL-1Ra. En otro aspecto más de la descripción, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a un epítipo contenido en la secuencia ESVDPKNYPKMKMEKRFVFNKIE (SEQ ID NO: 1). En otro aspecto de la descripción, el anticuerpo o fragmento de éste compite con la unión de un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6.

En otro aspecto más de la descripción, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a los aminoácidos 1-34 del extremo N de IL-1 β . Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es preparado por ingeniería humana, humanizado o humano.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste para uso en el tratamiento de un sujeto (por ejemplo, mamífero, ser humano) que presenta síntomas de, o que tiene riesgo de, desarrollar gota, en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, comprendiendo el uso administrar el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste al sujeto en una o más dosis.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste para uso en el tratamiento de la gota en un sujeto (por ejemplo, mamífero, ser humano), en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, comprendiendo el uso administrar el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste al ser humano, en el que la administración de una dosis inicial del anticuerpo IL-1 β o fragmento de anticuerpo está seguida de la administración de una o más dosis posteriores. En una realización, la administración de una dosis inicial del anticuerpo o fragmento de anticuerpo está seguida de la administración de dos o más dosis posteriores. En otra realización, la administración

de una dosis inicial del anticuerpo o fragmento de anticuerpo está seguida de la administración de una o más dosis posteriores, y en el que dichas una o más dosis posteriores están en 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 fragmento de anticuerpo está seguida de la administración de una o más dosis posteriores, y en el que al menos una de las dosis posteriores está en una cantidad que es mayor que la dosis inicial. En otra realización más, la administración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo es una vez para cada episodio de gota aguda. En el contexto de estas realizaciones, se describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo neutralizante) que se une a IL-1 β con una constante de disociación de menos de 100 pM. Dicho anticuerpo o fragmento de éste puede competir con la unión de un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 a IL-1 β .

En una realización, se administran dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, diez o más u once o más dosis posteriores del anticuerpo o fragmento de éste. En otra realización, la administración de la dosis inicial y de cada una de una o más dosis posteriores están separadas entre sí por 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 el contexto de estas realizaciones, se describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo neutralizante), que se une a IL-1 β con una constante de disociación de menos de 100 pM. Dicho anticuerpo o fragmento de éste puede competir con la unión de un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 a IL-1 β .

En otra realización, el anticuerpo o fragmento se administra en una o más dosis de 5 mg/kg o menos de anticuerpo o fragmento, 3 mg/kg o menos de anticuerpo o fragmento, 2 mg/kg o menos de anticuerpo o fragmento, 1 mg/kg o menos de anticuerpo o fragmento, 0,75 mg/kg o menos de anticuerpo o fragmento, 0,5 mg/kg o menos de anticuerpo o fragmento, 0,3 mg/kg o menos de anticuerpo o fragmento, 0,1 mg/kg o menos de anticuerpo o fragmento, 0,03 mg/kg o menos de anticuerpo o fragmento, 0,01 mg/kg o menos de anticuerpo o fragmento, 0,003 mg/kg o menos de anticuerpo o fragmento ó 0,001 mg/kg o menos de anticuerpo o fragmento. Preferiblemente, en cada una de las realizaciones mencionadas anteriormente, el anticuerpo o fragmento se administra en una o más dosis de al menos 0,01 mg/kg de anticuerpo o fragmento, al menos 0,01 mg/kg de anticuerpo o fragmento, o al menos 0,03 mg/kg de anticuerpo o fragmento. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento se administra en una o más 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 de dosificación anteriores se refieren a mg (anticuerpo o fragmento)/kg (peso del individuo que se va a tratar). En el contexto de estas realizaciones, se describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo neutralizante), que se une a IL-1 β con una constante de disociación de menos de 100 pM. Dicho anticuerpo o fragmento de éste puede competir con la unión de un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 a IL-1 β .

En otra realización, la dosis inicial y una o más dosis posteriores de anticuerpo o fragmento de éste son cada una de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de anticuerpo, de aproximadamente 0,03 a aproximadamente 1 mg/kg de anticuerpo, de aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,3 mg/kg de anticuerpo, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5 mg/kg de anticuerpo, de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg de anticuerpo, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg de anticuerpo, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg de anticuerpo, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 0,5 mg/kg de anticuerpo, de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg de anticuerpo, de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg de anticuerpo, de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg de anticuerpo, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg de anticuerpo, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg de anticuerpo, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg de anticuerpo, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg de anticuerpo, o de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg de anticuerpo. En determinadas realizaciones, se administran dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, diez o más u once o más dosis posteriores del anticuerpo o fragmento. Las cantidades de dosificación anteriores se refieren a mg (anticuerpo o fragmento)/kg (peso del individuo que se va a tratar). Lo mismo se aplica de aquí en adelante en la presente memoria si se menciona una cantidad de dosificación. En el contexto de estas realizaciones, se describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo neutralizante) que se une a IL-1 β con una constante de disociación de menos de 100 pM. Dicho anticuerpo o fragmento de éste puede competir con la unión de un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 a IL-1 β .

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste para uso en el tratamiento de la gota en un sujeto (por ejemplo, un ser humano), en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, comprendiendo el uso administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste al sujeto como una dosis inicial de aproximadamente 5 mg/kg o menos de anticuerpo o fragmento, 3 mg/kg o

menos de anticuerpo o fragmento, 2 mg/kg o menos de anticuerpo o fragmento, 1 mg/kg o menos de anticuerpo o fragmento, 0,75 mg/kg o menos de anticuerpo o fragmento, 0,5 mg/kg o menos de anticuerpo o fragmento, 0,3 mg/kg o menos de anticuerpo o fragmento, 0,1 mg/kg o menos de anticuerpo o fragmento, ó 0,03 mg/kg o menos de anticuerpo o fragmento, y una pluralidad de dosis posteriores de anticuerpo o fragmento en una cantidad aproximadamente igual o menor que la dosis inicial. En el contexto de estas realizaciones, se describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo neutralizante) que se une a IL-1 β con una constante de disociación de menos de 100 pM. Dicho anticuerpo o fragmento de éste puede competir con la unión de un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 a IL-1 β .

Preferiblemente, en las realizaciones mencionadas anteriormente en las que el anticuerpo o fragmento se administra como una dosis inicial y una pluralidad de dosis posteriores, la dosis de anticuerpo o fragmento es al menos 0,001 mg/kg de anticuerpo o fragmento al menos 0,003 mg/kg de anticuerpo o fragmento, al menos 0,01 mg/kg de anticuerpo o fragmento, al menos 0,03 mg/kg de anticuerpo o fragmento, al menos 0,05 mg/kg de anticuerpo o fragmento, o al menos 0,09 mg/kg de anticuerpo o fragmento. En el contexto de estas realizaciones, se describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo neutralizante) que se une a IL-1 β con una constante de disociación de menos de 100 pM. Dicho anticuerpo o fragmento de éste puede competir con la unión de un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 a IL-1 β .

En otro aspecto más de la invención, el anticuerpo o fragmento se administra como una dosis fija, independiente de una dosis por proporción de peso del sujeto. En una realización, el anticuerpo o fragmento se administra en una o más dosis fijas de 1.000 mg o menos de anticuerpo o fragmento, 750 mg o menos de anticuerpo o fragmento, 500 mg o menos de anticuerpo o fragmento, 250 mg o menos de anticuerpo o fragmento, 100 mg o menos de anticuerpo o fragmento, aproximadamente 25 mg o menos de anticuerpo o fragmento, aproximadamente 10 mg o menos de anticuerpo o fragmento, o aproximadamente 1,0 mg o menos de anticuerpo o fragmento. En otra realización, el anticuerpo o fragmento se administra en una o más dosis fijas de al menos aproximadamente 0,1 mg de anticuerpo o fragmento, al menos aproximadamente 1 mg de anticuerpo o fragmento, al menos aproximadamente 5 mg de anticuerpo o fragmento, o al menos aproximadamente 10 mg de anticuerpo o fragmento. En el contexto de estas realizaciones, se describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo neutralizante) que se une a IL-1 β con una constante de disociación de menos de 100 pM. Dicho anticuerpo o fragmento de éste puede competir con la unión de un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 a IL-1 β .

En determinadas realizaciones, la dosis fija es de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg, aproximadamente 1 mg a aproximadamente 25 mg, aproximadamente 10 mg a aproximadamente 25 mg, aproximadamente 10 mg a aproximadamente 50 mg, aproximadamente 10 mg a aproximadamente 100 mg, aproximadamente 25 mg a aproximadamente 50 mg, aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg, aproximadamente 50 mg a aproximadamente 100 mg, aproximadamente 50 mg a aproximadamente 150 mg, aproximadamente 100 mg a aproximadamente 150 mg, aproximadamente 100 mg a aproximadamente 200 mg, aproximadamente 150 mg a aproximadamente 200 mg, aproximadamente 150 mg a aproximadamente 250 mg, aproximadamente 200 mg a aproximadamente 250 mg, aproximadamente 200 mg a aproximadamente 300 mg, aproximadamente 250 mg a aproximadamente 300 mg, aproximadamente 250 mg a aproximadamente 500 mg, aproximadamente 300 mg a aproximadamente 400 mg, aproximadamente 400 mg a aproximadamente 500 mg, aproximadamente 400 mg a aproximadamente 600 mg, aproximadamente 500 mg a aproximadamente 750 mg, aproximadamente 600 mg a aproximadamente 750 mg, aproximadamente 700 mg a aproximadamente 800 mg, aproximadamente 750 mg a aproximadamente 1.000 mg. En una realización preferida, la dosis fija se administra en una o más dosis de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 100 mg, aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 100 mg o aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 50 mg. En otra realización preferida, la dosis fija se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg, aproximadamente 1 mg a aproximadamente 25 mg, aproximadamente 10 mg a aproximadamente 25 mg, aproximadamente 10 mg a aproximadamente 100 mg, aproximadamente 25 mg a aproximadamente 50 mg, aproximadamente 50 mg a aproximadamente 100 mg, aproximadamente 100 mg a aproximadamente 150 mg, aproximadamente 150 mg a aproximadamente 200 mg, aproximadamente 200 mg a aproximadamente 250 mg. En el contexto de estas realizaciones, se describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo neutralizante) que se une a IL-1 β con una constante de disociación de menos de 100 pM. Dicho anticuerpo o fragmento de éste puede competir con la unión de un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 a IL-1 β .

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste para uso en el tratamiento de la gota en un sujeto, en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, comprendiendo el uso administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste al sujeto, en el que la administración de una dosis inicial del anticuerpo o fragmento de anticuerpo está seguida de la administración de una o más dosis posteriores, y en el que se permite que la concentración plasmática de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo en el ser humano disminuya por debajo de un nivel de aproximadamente 0,1 ug/mL durante un periodo de tiempo mayor de aproximadamente 1 semana y menor de aproximadamente 6 meses entre administraciones durante un

curso de tratamiento con dicha dosis inicial y una o más dosis posteriores. En una realización, se permite que la concentración plasmática de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo disminuya por debajo de un nivel de aproximadamente 0,07 ug/mL, aproximadamente 0,05 ug/mL, aproximadamente 0,03 ug/mL o aproximadamente 0,01 ug/mL, durante un periodo de tiempo mayor de 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 2 semanas entre administraciones. En una realización, estos valores plasmáticos se refieren a valores obtenidos para un individuo que se trata con el anticuerpo o fragmento según la invención. En una realización, dicho individuo puede ser un paciente que padece gota. En el contexto de estas realizaciones, se describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo neutralizante) que se une a IL-1 β con una constante de disociación de menos de 100 pM. Dicho anticuerpo o fragmento de éste puede competir con la unión de un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 a IL-1 β .

La invención contempla que el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento para uso como se describe en la presente memoria, en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, puede administrarse en cualquiera de las cantidades de dosis, número de administraciones posteriores, e intervalos de dosificación entre administraciones mencionadas anteriormente, y que cualquiera de las cantidades de dosis descritas, número de administraciones posteriores, e intervalos de dosificación entre administraciones pueden combinarse entre sí en regímenes alternativos para modular el beneficio terapéutico. En determinadas realizaciones, la una o más dosis posteriores están en una cantidad que es aproximadamente igual o menor que la primera dosis administrada. En otra realización, la una o más dosis posteriores están en una cantidad que es aproximadamente mayor que la primera dosis administrada. Preferiblemente, el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento se administra por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa. La invención contempla que cada dosis de anticuerpo o fragmento puede administrarse en uno o más sitios. En el contexto de estas realizaciones, se describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo neutralizante) que se une a IL-1 β con una constante de disociación de menos de 100 pM. Dicho anticuerpo o fragmento de éste puede competir con la unión de un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 a IL-1 β .

En una realización, el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento, en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, se administra en combinación con al menos un otro tratamiento médicamente aceptado para la enfermedad, afección o complicación. En otra realización, el al menos un otro tratamiento médicamente aceptado para la enfermedad, afección o complicación se reduce o interrumpe, mientras el tratamiento con anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento se mantiene a un régimen de dosificación constante. En otra realización, el al menos un otro tratamiento médicamente aceptado para la enfermedad, afección o complicación se reduce o interrumpe, y el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento se reduce. En otra realización, el al menos un otro tratamiento médicamente aceptado para la enfermedad, afección o complicación se reduce o interrumpe, y el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento se incrementa. En otra realización más, el al menos un otro tratamiento médicamente aceptado para la enfermedad, afección o complicación se mantiene y el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento se reduce o interrumpe. En otra realización más, el al menos un otro tratamiento médicamente aceptado para la enfermedad, afección o complicación y el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento se reduce o interrumpe. En el contexto de estas realizaciones, se describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo neutralizante) que se une a IL-1 β con una constante de disociación de menos de 100 pM. Dicho anticuerpo o fragmento de éste puede competir con la unión de un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 a IL-1 β .

En otro aspecto, el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento, en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, para usos proporcionados en la presente memoria están en conjunción 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 del anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento. En otro aspecto más, los usos previenen 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 del anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento. En otro aspecto más, los usos reducen la cantidad, frecuencia o 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 del anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento. En otra realización más, el tratamiento con el al menos un agente activo se mantiene. En otra realización, el tratamiento con el al menos un agente activo se reduce o interrumpe, mientras el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento se mantiene a un régimen de dosificación constante. En otra realización, el tratamiento con el al menos un agente activo se reduce o interrumpe y el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento se reduce. En otra realización, el tratamiento con el al menos un agente activo se reduce o interrumpe y el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento se incrementa. En otra realización más, el tratamiento con el al menos un agente activo se mantiene y el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento se reduce o interrumpe. En otra realización más, el tratamiento con el al menos un agente activo y el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento se reduce o interrumpe. En el contexto de estas realizaciones, se describe un anticuerpo o fragmento de

anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo neutralizante) que se une a IL-1 β con una constante de disociación de menos de 100 pM. Dicho anticuerpo o fragmento de éste puede competir con la unión de un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 a IL-1 β .

5 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste para uso en el tratamiento de la gota en un sujeto, en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, comprendiendo el uso administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste al sujeto, en el que la administración de una dosis inicial del anticuerpo o fragmento de anticuerpo está seguida de la administración de una o más dosis posteriores, y en el que 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 ug/mL, al menos aproximadamente 0,05 ug/mL, al menos aproximadamente 0,08 ug/mL, al menos aproximadamente 0,1 ug/mL, al menos aproximadamente 0,15 ug/mL, al menos aproximadamente 0,2 ug/mL, al menos aproximadamente 0,25 ug/mL, al menos aproximadamente 0,3 ug/mL, al menos aproximadamente 0,4 ug/mL, al menos aproximadamente 0,5 ug/mL, al menos aproximadamente 0,6 ug/mL, al menos aproximadamente 0,8 ug/mL, al menos aproximadamente 1 ug/mL, al menos aproximadamente 1,5 ug/mL, al menos aproximadamente 2 ug/mL, al menos aproximadamente 3 ug/mL, al menos aproximadamente 4 ug/mL, o al menos aproximadamente 5 ug/mL, durante un curso de tratamiento con dicha dosis inicial y una o más dosis posteriores. En una realización, estos valores plasmáticos se refieren a valores obtenidos para un individuo que se trata con el anticuerpo o fragmento según la invención. En una realización, dicho individuo puede ser un paciente que padece gota. En el contexto de estas realizaciones, se describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo neutralizante) que se une a IL-1 β con una constante de disociación de menos de 100 pM. Dicho anticuerpo o fragmento de éste puede competir con la unión de un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 a IL-1 β .

25 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste para uso en el tratamiento de la gota en un sujeto, en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, comprendiendo el uso administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste al sujeto, en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una CI_{50} menor que un antagonista del receptor IL-1 β en un ensayo de inhibición de IL-1 β en sangre humana completa que mide la producción inducida por IL-1 β de IL-8. En una realización, el anticuerpo o fragmento tiene una CI_{50} que es menor de aproximadamente 90%, 80%, 70%, 60%, 50% de la CI_{50} de un antagonista del receptor IL-1 β en un ensayo de inhibición de IL-1 β en sangre humana completa que mide la producción inducida por IL-1 β de IL-8. En una realización adicional, el anticuerpo o fragmento tiene una CI_{50} que es menor de aproximadamente 40%, 30%, 20%, 10% de la CI_{50} de un antagonista del receptor IL-1 β en un ensayo de inhibición de IL-1 β en sangre humana completa que mide la producción inducida por IL-1 β de IL-8. En una realización preferida, el anticuerpo o fragmento tiene una CI_{50} que es menor de aproximadamente 8%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% de la CI_{50} de un antagonista del receptor IL-1 β en un ensayo de inhibición de IL-1 β en sangre humana completa que mide la producción inducida por IL-1 β de IL-8. En una realización, el antagonista del receptor IL-1 β es anakinra (es decir, Kineret®). En el contexto de estas realizaciones, se describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo neutralizante) que se une a IL-1 β con una constante de disociación de menos de 100 pM. Dicho anticuerpo o fragmento de éste puede competir con la unión de un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 a IL-1 β .

45 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste para uso en el tratamiento de la gota en un sujeto, en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, comprendiendo el uso administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste al sujeto, en el que el anticuerpo o fragmento de éste proporciona inhibición *in vivo* de la liberación de IL-6 estimulada por IL-1 β en ratones comparado con un anticuerpo control usando un ensayo que describen Economides et al., *Nature Med.*, 9: 47-52 (2003). En una realización, el anticuerpo o fragmento proporciona inhibición *in vivo* de la liberación de IL-6 estimulada por IL-1 β en ratones de al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50% comparado con el anticuerpo control. En una realización adicional, el anticuerpo o fragmento proporciona inhibición *in vivo* de la liberación de IL-6 estimulada por IL-1 β en ratones de al menos aproximadamente 60%, 70%, 80%, 90%, 95% comparado con el anticuerpo control. En una realización, el anticuerpo control es un anticuerpo control de isotipo. En el contexto de estas realizaciones, se describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo neutralizante) que se une a IL-1 β con una constante de disociación de menos de 100 pM. Dicho anticuerpo o fragmento de éste puede competir con la unión de un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 a IL-1 β .

60 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste para uso en el tratamiento de la gota en un sujeto, en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, comprendiendo el uso administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste al sujeto, en el que el anticuerpo o fragmento de éste inhibe la producción de citoquinas inducida por *Staphylococcus epidermidis* en sangre humana completa comparado con un control en el que no se usa anticuerpo. En una realización, el anticuerpo o fragmento proporciona un mayor nivel de inhibición de la producción de citoquinas inducida por *Staphylococcus epidermidis* en sangre

humana completa de al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50% comparado con el control. En una realización adicional, el anticuerpo o fragmento proporciona un mayor nivel de inhibición de la producción de citoquinas inducida por *Staphylococcus epidermidis* en sangre humana completa de al menos aproximadamente 60%, 70%, 80%, 90%, 95% comparado con el control. En una realización, las citoquinas inhibidas son IL-1 β , IL-1a, IL-6, IL-8, IL-1Ra, TNF α o IFN γ . En el contexto de estas realizaciones, se describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo neutralizante) que se une a IL-1 β con una constante de disociación de menos de 100 pM. Dicho anticuerpo o fragmento de éste puede competir con la unión de un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 a IL-1 β .

En otro aspecto, la invención describe un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste para uso en el tratamiento de la gota, en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 y que tiene una CI₅₀ menor que un antagonista del receptor IL-1 β en un ensayo de inhibición de IL-1 β en sangre humana completa que mide la producción inducida por IL-1 β de IL-8. En una realización, el antagonista del receptor IL-1 β es anakinra (es decir, Kineret®). En el contexto de estas realizaciones, se describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo neutralizante) que se une a IL-1 β con una constante de disociación de menos de 100 pM. Dicho anticuerpo o fragmento de éste puede competir con la unión de un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 a IL-1 β .

En otro aspecto de la invención, se contempla un medicamento para uso en el tratamiento o prevención de la gota que comprende un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste, en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6. En cualquiera de los usos, el medicamento puede coordinarse con tratamiento usando un segundo agente activo. En otra realización de la invención, se contempla una combinación sinérgica del anticuerpo de la invención para uso en el tratamiento de un paciente que presenta síntomas de o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o afección como se describe en la presente memoria, en el que el medicamento se coordina con tratamiento usando un segundo agente activo. Se contemplan las realizaciones de cualquiera de los usos mencionados anteriormente, en el que la cantidad de anticuerpo que une IL-1 β o fragmento en el medicamento es a una dosis eficaz para reducir la dosificación del segundo agente activo requerida para conseguir un efecto terapéutico. En el contexto de estas realizaciones, se describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo neutralizante) que se une a IL-1 β con una constante de disociación de menos de 100 pM. Dicho anticuerpo o fragmento de éste puede competir con la unión de un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 a IL-1 β .

En otro aspecto más de la descripción, se proporciona un artículo de fabricación, que comprende un contenedor, una composición en el contenedor que comprende un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste, en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, y un prospecto que contiene instrucciones para administrar el anticuerpo o fragmento a un ser humano que necesita tratamiento según los usos mencionados anteriormente de la invención. En una realización, el contenedor comprende además un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente adecuado. En una realización relacionada, la composición en el contenedor comprende además un segundo agente activo. En el contexto de estas realizaciones, se describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo neutralizante) que se une a IL-1 β con una constante de disociación de menos de 100 pM. Dicho anticuerpo o fragmento de éste puede competir con la unión de un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 a IL-1 β .

La presente descripción también contempla kits. En una realización, un kit comprende una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento, en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, envasado en un contenedor, tal como un vial o botella, y que comprende además una etiqueta unida a o envasada con el contenedor, describiendo la etiqueta los contenidos del contenedor y proporcionando indicaciones y/o instrucciones respecto al uso de los contenidos del contenedor para el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección según los usos mencionados anteriormente de la invención. En una realización, el contenedor contiene además un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente adecuado. En una realización relacionada, el contenedor contiene además un segundo agente activo. En el contexto de estas realizaciones, se describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo neutralizante) que se une a IL-1 β con una constante de disociación de menos de 100 pM. Dicho anticuerpo o fragmento de éste puede competir con la unión de un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 a IL-1 β .

En una realización, el artículo de fabricación, kit o medicamento es para uso en el tratamiento o prevención de gota en un sujeto. En otra realización, las instrucciones de un prospecto de un artículo de fabricación o etiqueta de un kit comprende instrucciones para la administración del anticuerpo o fragmento según cualquiera de las cantidades de dosis, número de administraciones posteriores, e intervalos de dosificación entre administraciones mencionados anteriormente, así como cualquier combinación de cantidades de dosis, número de administraciones posteriores, e intervalos de dosificación entre administraciones descritos en la presente memoria. En el contexto de otra realización más, que se describe en el contexto de la presente invención, el contenedor de kit o artículo de fabricación es una

jeringa pre-cargada. En estas realizaciones, se puede usar, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo neutralizante) que se une a IL-1 β con una constante de disociación de menos de 100 pM. Dicho anticuerpo o fragmento de éste puede competir con la unión de un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 a IL-1 β

- 5 En otro aspecto de la descripción, se proporciona un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste que se describe para uso en el tratamiento de la liberación de una citoquina pro-inflamatoria inducida por cristales de urato monosódico (MSU) en un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano), en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, comprendiendo dicho uso administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste al sujeto. En una realización, la citoquina pro-inflamatoria es IL-1 β . En otra realización, la citoquina pro-inflamatoria es IL-6. En el contexto de estas realizaciones, se describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo neutralizante) que se une a IL-1 β con una constante de disociación de menos de 100 pM. Dicho anticuerpo o fragmento de éste puede competir con la unión de un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 a IL-1 β .

15 Descripción breve de los dibujos

La Fig. 1 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento de inhibición de IL-1 β *in vitro* para el anticuerpo designado AB7 y para Kineret® que implica la producción de IL-8 inducida por IL-1.

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

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

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

- 25 La Fig. 4 es un gráfico que muestra las concentraciones séricas después de la administración de 0,3, ó 3 mg/kg de un anticuerpo anti-IL-1 β en monos *Cynomolgus*.

La Fig. 5 es un gráfico que modela los perfiles de concentración plasmática de un anticuerpo anti-IL-1 β en monos *Cynomolgus* después de cinco dosis mensuales de 0,1, 0,3, 1 ó 3 mg/kg.

- 30 La Fig. 6 es una tabla que muestra la reducción de la producción de citoquinas inducida por *Staphylococcus epidermidis* en sangre humana completa por tratamiento con un anticuerpo anti-IL-1 β .

La Fig. 7 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. 8 es un gráfico que muestra las concentraciones séricas después de la administración de 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, ó 1,0 mg/kg de un anticuerpo anti-IL-1 β en sujetos humanos con diabetes de Tipo 2.

- 35 La Figura 9 es un gráfico que muestra el cambio de porcentaje mediano en CRP en el día 28 después de la administración de 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, ó 1,0 mg/kg de un anticuerpo anti-IL-1 β en sujetos humanos con diabetes de Tipo 2.

Las Fig. 10A y 10B son gráficos que muestran la eficacia de un anticuerpo anti-IL-1 β en un modelo de ratón de gota aguda inducida por cristales MSU.

40 Descripción detallada

La presente descripción está dirigida a un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste para uso en el tratamiento de gota (por ejemplo, gota aguda, gota crónica, gota refractaria) en un sujeto, en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, comprendiendo el uso administrar al sujeto una o más dosis de un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste.

- 45 Debido a los problemas con los tratamientos actuales, se necesitan nuevas terapias para tratar la gota para reemplazar o complementar las estrategias farmacéuticas disponibles. Los usos descritos en la presente memoria comprenden, por ejemplo, administrar un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste, en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6. Los usos dirigidos directamente al ligando IL-1 β con un anticuerpo, particularmente anticuerpos que presentan alta afinidad, proporcionan ventajas sobre otros métodos de tratamiento potenciales, tales como antagonistas del receptor IL-1 β (por ejemplo, IL-1Ra, Anakinra, Kineret®). El reto para los terapéuticos basados en antagonista del receptor IL-1 es la necesidad de que dichos terapéuticos ocupen un gran número de receptores, lo que es una tarea formidable ya que estos receptores están expresados ampliamente en todas las células excepto las células rojas de la sangre (Dinarelo, Curr. Opin. Pharmacol. 4: 378-385, 2004). En la mayor

parte de las enfermedades mediadas por inmunidad, tales como las enfermedades descritas en la presente memoria, la cantidad de citoquina IL-1 β que es mensurable en los fluidos corporales o asociada con células activadas es relativamente baja. Como se ilustra en los Ejemplos siguientes, hemos encontrado sorprendentemente que los anticuerpos, tales como los descritos en la presente memoria, pueden usarse para conseguir el nivel deseado de actividad en un rango amplio de dosis, incluyendo a dosis muy bajas. Así, un método de tratamiento y/o prevención dirigido directamente al ligando IL-1 β proporcionaría una estrategia superior.

IL-1 β es una citoquina pro-inflamatoria secretada por varios tipos celulares diferentes incluyendo monocitos y macrófagos. Cuando se libera como parte de una reacción inflamatoria, IL-1 β produce un rango de efectos biológicos, principalmente mediados a través de la inducción de otros mediadores inflamatorios tales como corticotrofina, factor 4 de plaquetas, prostaglandina E2 (PGE2), IL-6, e IL-8. IL-1 β induce efectos inflamatorios tanto locales como sistémicos a través de la activación del receptor de IL-1 encontrado en casi todos los tipos celulares.

La familia interleuquina-1 (IL-1) de citoquinas se ha implicado en varios estados patológicos tales como artritis reumatoide (RA), osteoartritis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa (UC), choque séptico, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), asma, enfermedad de injerto frente a huésped, aterosclerosis, leucemia de células T del adulto, mieloma múltiple, esclerosis múltiple, ictus, y enfermedad de Alzheimer. Los miembros de la familia IL-1 incluyen IL-1 α , IL-1 β , e IL-1Ra. Aunque están relacionadas por su capacidad de unirse a receptores IL-1 (IL-1R1, IL-1R2), cada una de estas citoquinas se expresa por un gen diferente y tiene una secuencia de aminoácidos primaria diferente. Además, las actividades fisiológicas de estas citoquinas pueden distinguirse entre sí.

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

Como se ha indicado anteriormente, se ha sugerido el polipéptido antagonista del receptor IL-1 (IL-1Ra) para uso en el tratamiento de la gota (So et al., 2007, *ibid*; McGonagle et al., 2007, *ibid*), pero permanece una necesidad de medios eficaces para tratar la gota, particularmente los que no requieren inyecciones diarias, repetidas. Un reto adicional para los terapéuticos basados en antagonista del receptor IL-1 es la necesidad de que dichos terapéuticos ocupen un gran número de receptores, lo que es una tarea formidable ya que estos receptores están expresados ampliamente en todas las células excepto las células rojas de la sangre (Dinarelli, Curr. Opin. Pharmacol. 4: 378-385, 2004). En la mayor parte de las enfermedades mediadas por inmunidad, tales como las enfermedades descritas en la presente memoria, la cantidad de citoquina IL-1 β que es mensurable en los fluidos corporales o asociada con células activadas es relativamente baja. Así, un método para el tratamiento y/o prevención que está dirigido directamente al ligando IL-1 β es una estrategia superior, particularmente cuando se administra un anticuerpo IL-1 β con alta afinidad.

La presente invención proporciona un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste para uso en el tratamiento y/o prevención de gota en un sujeto (por ejemplo, mamífero, ser humano), en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6.

Como se muestra en el Ejemplo 1 más adelante, hemos encontrado sorprendentemente que dicho anticuerpo (por ejemplo, con muy alta afinidad) puede ser un inhibidor mucho más potente de la ruta IL-1 de lo que es IL-Ra (por ejemplo, Kineret®), y proporciona una oportunidad de conseguir un efecto terapéutico a una dosis menor y/o con una administración menos frecuente que la necesaria para otros fármacos, tales como IL-1Ra recombinante.

Dichos usos como se describe en la presente memoria con un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento pueden incluir el tratamiento de un sujeto que padece gota (por ejemplo, gota aguda, gota crónica, gota refractaria). Los usos también pueden incluir prevenir la aparición de gota (por ejemplo, gota aguda, gota crónica, gota refractaria) en un sujeto en riesgo.

Anticuerpos, Anticuerpos Humanizados, y Anticuerpos Humanos preparados por Ingeniería

Los anticuerpos de unión a IL-1 (por ejemplo, IL-1 β) descritos en el contexto de la presente descripción pueden proporcionarse como anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAb), anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados con CDR, anticuerpos completamente humanos, anticuerpos de cadena única, y/o anticuerpos biespecíficos, así como fragmentos, incluyendo variantes y derivados de éstos, proporcionados por técnicas conocidas, incluyendo, pero no limitado a escisión enzimática, síntesis de péptidos o técnicas recombinantes.

Los anticuerpos comprenden generalmente dos polipéptidos de cadena pesada y dos polipéptidos de cadena ligera, aunque también se contemplan anticuerpos de dominio único que tienen una cadena pesada y una cadena ligera, y anticuerpos de cadena pesada desprovistos de cadenas ligeras. Existen cinco tipos de cadenas pesadas, denominadas alfa, delta, épsilon, gamma y mu, tomando como base la secuencia de aminoácidos del dominio constante de cadena pesada. Estos diferentes tipos de cadenas pesadas dan lugar a cinco clases de anticuerpos,

IgA (incluyendo IgA₁ e IgA₂), IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, incluyendo cuatro subclases de IgG, concretamente IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. También existen dos tipos de cadenas ligeras, denominadas kappa (κ) o lambda (λ) tomando como base 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 de unión a antígeno de un anticuerpo. Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo descrito en la presente memoria pueden incluir fragmentos de anticuerpo Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v). Como se discute con más detalle más adelante, los fragmentos de unión a IL-1β engloban fragmentos de anticuerpo y polipéptidos de unión a antígeno que se unirán a IL-1β.

Cada una de las secuencias de cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno de éste, incluye una región variable con tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) así como regiones marco (FR) no CDR. Los términos "cadena pesada" y "cadena ligera", tal y como se usan en la presente memoria, significan la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera, respectivamente, a no ser que se indique otra cosa. Las CDR de cadena pesada se refieren en la presente memoria como CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3. Las CDR de cadena ligera se refieren en la presente memoria como CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3. Las regiones variables y CDR en una secuencia de anticuerpo pueden identificarse (i) según las reglas 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 se describen en Kontermann y Dubel, eds., *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 anticuerpo se describen en y se puede acceder a ellas a través de la base de datos "The Kabatman" en www.bioinf.org.uk/abs (mantenida por A.C. Martin en el Department of Biochemistry & Molecular Biology University College London, Londres, Inglaterra) y VBASE2 en www.vbase2.org, como se describe en Retter et al., *Nucl. Acids Res.*, 33(Database issue): D671-D674 (2005). El sitio de internet de la base de datos "Kabatman" también incluye reglas generales para identificar CDR. El término "CDR", tal y como se usa en la presente memoria, es como se define en Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*, 5^a ed., U.S. Department of Health and Human Services, 1991, a no ser que se indique otra cosa.

Los anticuerpos policlonales se producen preferiblemente en animales por inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) múltiples del antígeno relevante y un adyuvante. Una respuesta mejorada de anticuerpo puede obtenerse conjugando el antígeno relevante con una proteína que es inmunogénica en la especie que se va a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster sulfosuccinimida de maleimidobenzilo (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico u otros agentes conocidos en la técnica.

Anticuerpo monoclonal se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos. Los anticuerpos monoclonales son generalmente altamente específicos, y pueden dirigirse frente a un único sitio antigénico, a diferencia de preparaciones de anticuerpo convencionales (policlonales) que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos frente a diferentes determinantes (epítopos). Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos ya que se sintetizan por el cultivo homogéneo, no contaminado con otras inmunoglobulinas con diferentes especificidades y características.

Los anticuerpos monoclonales que se van a usar según la presente invención pueden prepararse por el método del hibridoma descrito por Kohler et al., (*Nature*, 256: 495-7, 1975), o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Patente U.S. No. 4.816.567). Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas, por ejemplo, en 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 huésped apropiado, tal como un hámster o mono macaco, se inmuniza como se describe en la presente memoria para incitar a los linfocitos a producir o ser capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse in vitro. Los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilén glicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, p. 59-103 (Acedamic Press, 1986)).

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

Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, soportan una producción estable de alto nivel de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromiéloma 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*, p. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)). Las líneas de mieloma

murino ejemplares incluyen aquellas derivadas de tumores de ratón MOP-21 y M.C.-1 1 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. EEUU, y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Md. EEUU.

5 El medio de cultivo en el que las células de hibridoma se crecen se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos frente al antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, por análisis Scatchard (Monson et al., Anal. Biochem., 107: 220 (1980)).

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

Se contempla además que los anticuerpos de la invención pueden usarse como fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno más pequeños muy conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria.

20 La presente invención engloba anticuerpos de unión a IL-1 (por ejemplo, IL-1 β) que incluyen dos cadenas pesadas de longitud completa y dos cadenas ligeras de longitud completa. Alternativamente, los anticuerpos de unión a IL-1 β pueden ser construcciones tales como anticuerpos de cadena única o "mini" anticuerpos que retienen la actividad de unión a IL-1 β . Dichas construcciones pueden prepararse por métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, la clonación mediada por PCR y ensamblaje de anticuerpos de cadena única para expresión en *E. coli* (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 construcción, las partes variables de las cadenas pesada y ligera de una molécula de anticuerpo se amplifican por PCR a partir de ADNc. Los amplicones resultantes se ensamblan, por ejemplo, en una segunda etapa de PCR, a través de un ADN conector que codifica un conector proteico flexible compuesto por los aminoácidos Gly y Ser. Este conector permite que las partes variables de cadena pesada y ligera se plieguen de tal manera que el bolsillo de unión a antígeno se regenera y el antígeno se une con afinidades frecuentemente comparables con la molécula de inmunoglobulina dimérica parental de longitud completa.

35 Los anticuerpos de unión a IL-1 (por ejemplo, IL-1 β) y fragmentos de la presente invención engloban variantes de los anticuerpos ejemplarizados, fragmentos y secuencias descritos en la presente memoria. Las variantes incluyen péptidos y polipéptidos que comprenden una o más sustituciones, deleciones, y/o adiciones en la secuencia de aminoácidos que tienen la misma o sustancialmente la misma afinidad y especificidad de unión a epítipo que uno o más de los anticuerpos ejemplarizados, fragmentos y secuencias descritos en la presente memoria. Así, las variantes incluyen péptidos y polipéptidos que comprenden una o más sustituciones, deleciones, y/o adiciones en la secuencia de aminoácidos en los anticuerpos ejemplarizados, fragmentos y secuencias descritos en la presente memoria, en el que dichas sustituciones, deleciones, y/o adiciones no causan cambios sustanciales en la afinidad y especificidad de la unión a epítipo. Por ejemplo, una variante de un anticuerpo o fragmento puede resultar de uno o más cambios a un anticuerpo o fragmento, en el que el anticuerpo cambiado o fragmento tiene la misma o sustancialmente la misma afinidad y especificidad de unión a epítipo que la secuencia de partida. Las variantes pueden ser naturales, tales como variantes alélicas o de corte y empalme, o pueden construirse artificialmente. Las variantes pueden prepararse a partir de las moléculas de ácido nucleico correspondientes que codifican dichas variantes. Las variantes de los presentes anticuerpos y fragmentos de unión a IL-1 β pueden tener cambios en las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y/o pesada que son naturales o se introducen por ingeniería *in vitro* de secuencias nativas usando técnicas de ADN recombinante. Las variantes naturales incluyen variantes "somáticas" que se generan *in vivo* en las secuencias de nucleótidos de la línea germinal correspondiente durante la generación de una respuesta de anticuerpo a un antígeno extraño.

50 Las variantes de anticuerpos de unión a IL-1 (por ejemplo, IL-1 β) y fragmentos de unión también pueden prepararse por técnicas de mutagénesis. Por ejemplo, pueden introducirse cambios en aminoácidos aleatoriamente a lo largo de una región codificadora de anticuerpo y las variantes resultantes pueden cribarse para afinidad de unión para IL-1 β o para otra propiedad. Alternativamente, pueden introducirse cambios en aminoácidos en regiones seleccionadas de un anticuerpo IL-1 β , tal como en las CDR de cadena ligera y/o pesada, y/o en las regiones marco, y los anticuerpos resultantes pueden cribarse para unión a IL-1 β o alguna otra actividad. Los cambios en aminoácidos engloban una o más sustituciones de aminoácidos en una CDR, que varían de una única diferencia de aminoácidos a la introducción de múltiples permutaciones de aminoácidos en una CDR dada, tal como CDR3. En otro método, la contribución de cada residuo en una CDR a la unión de IL-1 β puede evaluarse por sustitución de al menos un residuo en la CDR con alanina. Lewis *et al.* (1995), Mol. Immunol. 32: 1065-72. Los residuos que no son óptimos para la unión a IL-1 β pueden cambiarse con el fin de determinar una secuencia más óptima. También se engloban variantes generadas

por inserción de aminoácidos para incrementar el tamaño de una CDR, tal como CDR3. Por ejemplo, a mayor parte de las secuencias de CDR3 de cadena ligera tienen una longitud de nueve aminoácidos. Las secuencias de cadena ligera en un anticuerpo que son más cortas de nueve residuos pueden optimizarse para unión a IL-1 β por inserción de los aminoácidos apropiados para incrementar la longitud de la CDR.

5 Las variantes también pueden prepararse por "intercambio de cadenas" de cadenas ligeras o pesadas. Marks et al. (1992), *Biotechnology* 10: 779-83. Una única cadena ligera (o pesada) puede combinarse con una biblioteca que tiene un repertorio de cadenas pesadas (o ligeras) y la población resultante se criba para una actividad deseada, tal como unión a IL-1 β . Esto permite cribar una muestra mayor de diferentes cadenas pesadas (o ligeras) en combinación con una única cadena ligera (o pesada) de lo que es posible con bibliotecas que comprenden
10 repertorios tanto de cadenas pesadas como ligeras.

Los anticuerpos de unión a IL-1 (por ejemplo, IL-1 β) y fragmentos de la presente invención engloban derivados de los anticuerpos ejemplarizados, fragmentos y secuencias descritos en la presente memoria. Los derivados incluyen polipéptidos o péptidos, o variantes, fragmentos o derivados de éstos, que se han modificado químicamente. Los ejemplos incluyen la unión covalente de uno o más polímeros, tal como polímeros solubles en agua, carbohidratos unidos por N, o unidos por O, azúcares, fosfatos, y/o otras de dichas moléculas. Los derivados se modifican de una
15 manera que es diferente del péptido o polipéptidos naturales o de partida, bien en el tipo o localización de las moléculas unidas. Los derivados incluyen además la delección de uno o más grupos químicos que están presentes naturalmente en el péptido o polipéptido.

Los anticuerpos de unión a IL-1 β y fragmentos de la presente invención pueden ser biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos o fragmentos pueden tener varias configuraciones. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden parecerse a anticuerpos únicos (o fragmentos de anticuerpo) pero tienen dos sitios de unión a antígeno diferentes (regiones variables). Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse por técnicas químicas (Kranz et al. (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 5807), por técnicas de "polidoma" (Pat. U.S. No. 4.474.893) o por técnicas de ADN recombinante. Los anticuerpos biespecíficos de la presente invención pueden tener especificidades de unión para al
20 menos dos epítomos diferentes, al menos uno de los cuales es un epítomo de IL-1 β . Los anticuerpos de unión a IL-1 β y fragmentos también pueden ser heteroanticuerpos. Los heteroanticuerpos son dos o más anticuerpos, o fragmentos de unión de anticuerpo (Fab) unidos entre sí, teniendo cada anticuerpo o fragmento una especificidad diferente.

Las técnicas para crear versiones de ADN recombinante de las regiones de unión a antígeno de moléculas de anticuerpo que evitan la generación de anticuerpos monoclonales se contemplan para los presentes anticuerpos de unión a IL-1 (por ejemplo, IL-1 β) y fragmentos. El ADN se clona en un sistema de expresión bacteriano. Un ejemplo de dicha técnica adecuada para la práctica de esta invención usa un sistema de vector de bacteriófago lambda que tiene una secuencia líder que causa que la proteína Fab expresada migre al espacio periplásmico (entre la membrana celular y la pared celular bacteriana) o se secrete. Se pueden generar y cribar rápidamente grandes
30 números de fragmentos Fab funcionales para aquellos que se unen a IL-1 β . Dichos agentes de unión a IL-1 β (fragmentos Fab con especificidad para un polipéptido IL-1 β) se engloban específicamente en los anticuerpos de unión a IL-1 β y fragmentos de la presente invención.

Los presentes anticuerpos de unión a IL-1 (por ejemplo, IL-1 β) y fragmentos pueden ser anticuerpos humanizados o humanos preparados por ingeniería. Tal y como se usa en la presente memoria, un anticuerpo humanizado, o fragmento de unión a antígeno de éste, es un polipéptido recombinante que comprende una parte de un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo no humano y una parte de las regiones marco y/o constantes de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humano preparado por ingeniería o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo no humano (por ejemplo, de ratón) que se ha preparado por ingeniería mediante la modificación (por ejemplo, delección, inserción, o sustitución) de aminoácidos en posiciones específicas de manera que se reduce o elimina cualquier
40 inmunogenicidad detectable del anticuerpo modificado en un ser humano.

Los anticuerpos humanizados incluyen anticuerpos quiméricos y anticuerpos injertados con CDR. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos que incluyen una región variable de anticuerpo no humano unida a una región constante humana. Así, en los anticuerpos quiméricos, la región variable es mayoritariamente no humana, y la región constante es humana. Los anticuerpos quiméricos y los métodos para prepararlos se describen en Morrison, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6841-6855 (1984), Boulianne, et al., *Nature*, 312: 643-646 (1984), y la Publicación de Solicitud PCT WO 86/01533. Aunque pueden ser menos inmunogénicos que un anticuerpo monoclonal de ratón, las administraciones de anticuerpos quiméricos se han asociado con respuestas de anticuerpo humano anti-ratón (HAMA) a la parte no humana de los anticuerpos. Los anticuerpos quiméricos también pueden producirse por corte y empalme de los genes de una molécula de anticuerpo de ratón con una especificidad de unión a antígeno apropiada
50 junto con genes de una molécula de anticuerpo humano con la actividad biológica apropiada, tal como la capacidad para activar el complemento humano y mediar ADCC. Morrison et al. (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81: 6851; Neuberger et al. (1984), *Nature*, 312: 604. Un ejemplo es el reemplazo de una región Fc con la de un isotipo diferente.

Los anticuerpos injertados con CDR son anticuerpos que incluyen las CDR de un anticuerpo "donante" no humano unidas a la región marco de un anticuerpo "receptor" humano. Generalmente, los anticuerpos injertados con CDR
60

incluyen más secuencias de anticuerpo humano que los anticuerpos quiméricos porque incluyen tanto secuencias de región constante como secuencias de región variable (marco) de anticuerpos humanos. Así, por ejemplo, un anticuerpo humanizado injertado con CDR de la invención puede comprender una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos contiguos (por ejemplo, aproximadamente 5 o más, 10 o más, o incluso 15 o más residuos de aminoácidos contiguos) de la región marco de un anticuerpo humano (por ejemplo, FR-1, FR-2, o FR-3 de un anticuerpo humano) u, opcionalmente, la mayor parte de o toda la región marco competa de un anticuerpo humano. Los anticuerpos injertados con CDR y los métodos para prepararlos 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 pueden usarse para producir anticuerpos humanizados también se describen en las Patentes U.S. 4.816.567, 5.721.367, 5.837.243, y 6.180.377. Se considera menos probable que los anticuerpos injertados con CDR, comparado con los anticuerpos quiméricos, induzcan una reacción inmune frente a partes de anticuerpo no humanas. Sin embargo, se ha reportado que las secuencias marco de los anticuerpos donantes se requieren para la afinidad y/o especificidad de unión del anticuerpo donante, presumiblemente porque estas secuencias marco afectan el plegamiento de la parte de unión a antígeno del anticuerpo donante. Por lo tanto, cuando las secuencias de CDR no humanas donantes se injertan en secuencias marco humanas no alteradas, el anticuerpo injertado con CDR resultante puede presentar, en algunos casos, pérdida de avidéz de unión respecto al anticuerpo donante no humano original. Véase, por ejemplo, Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988), y Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988).

Los anticuerpos humanos preparados por ingeniería incluyen por ejemplo anticuerpos "recubiertos" y anticuerpos preparados usando tecnología HUMAN ENGINEERING™ (véase, por ejemplo, las Patentes U.S. 5.766.886 y 5.869.619). La tecnología HUMAN ENGINEERING™ está disponible comercialmente, e implica alterar un anticuerpo no humano o fragmento de anticuerpo, tal como un anticuerpo de ratón o quimérico o fragmento de anticuerpo, haciendo cambios específicos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de manera que se produce un anticuerpo modificado con inmunogenicidad reducida en un ser humano que sin embargo retiene las propiedades de unión deseables de los anticuerpos no humanos originales. Generalmente, la técnica implica clasificar los residuos de aminoácidos de un anticuerpo no humano (por ejemplo, de ratón) como residuos de "riesgo bajo", "riesgo moderado", o "riesgo alto". La clasificación se lleva a cabo usando un cálculo de riesgo/recompensa global que evalúa los beneficios predichos de hacer sustitución particular (por ejemplo, para inmunogenicidad en seres humanos) frente al riesgo de que la sustitución afectará el plegamiento y/o propiedades de unión a antígeno del anticuerpo resultante. Así, una posición de riesgo bajo es una para la que se predice que una sustitución es beneficiosa porque se predice que reduce la inmunogenicidad sin afectar significativamente las propiedades de unión a antígeno. Una posición de riesgo moderado es una para la que se predice que una sustitución reduce la inmunogenicidad, pero es más probable que afecte el plegamiento de la proteína y/o propiedades de unión a antígeno. Las posiciones de riesgo alto contienen residuos más probablemente implicados en el plegamiento apropiado o unión a antígeno. Generalmente, las posiciones de riesgo bajo en un anticuerpo no humano se sustituyen con residuos humanos, las posiciones con riesgo alto se sustituyen raramente, y las sustituciones humanizantes en posiciones de riesgo moderado se hacen algunas veces, aunque no indiscriminadamente. Las posiciones con prolinas en la secuencia de la región variable de anticuerpo no humano se clasifican habitualmente como posiciones con al menos riesgo moderado.

El residuo de aminoácido humano particular que se va a sustituir en una posición dada de riesgo bajo o moderado de una secuencia de anticuerpo no humano (por ejemplo, de ratón) puede seleccionarse alineando una secuencia de aminoácidos 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 de riesgo bajo o moderado en la secuencia no humana pueden sustituirse con los residuos correspondientes en la secuencia de anticuerpo humano según el alineamiento. Las técnicas para preparar proteínas humanas por ingeniería se describen con mayor detalle en Studnicka et al., *Protein Engineering*, 7: 805-814 (1994), Patentes U.S. 5.766.886, 5.770.196, 5.821.123, y 5.869.619, y Publicación de Solicitud PCT WO 93/11794.

Los anticuerpos "recubiertos" son anticuerpos no humanos o humanizados (por ejemplo, anticuerpos quiméricos o injertados con CDR) que se han preparado por ingeniería para reemplazar determinados residuos de aminoácidos expuestos a disolvente para reducir adicionalmente su inmunogenicidad o aumentar su función. Como se presume que los residuos de superficie de un anticuerpo quimérico afectan menos probablemente el plegamiento apropiado del anticuerpo y más probablemente incitan una reacción inmune, el recubrimiento de un anticuerpo quimérico puede incluir, por ejemplo, identificar los residuos expuestos a disolvente en la región marco no humana de un anticuerpo quimérico y reemplazar al menos uno de ellos con los residuos de superficie correspondientes de una región marco humana. El recubrimiento puede conseguirse por cualquier técnica de ingeniería adecuada, incluyendo el uso de la tecnología HUMAN ENGINEERING™ descrita anteriormente.

En una estrategia diferente, puede conseguirse una recuperación de la avidéz de unión mediante la "deshumanización" de un anticuerpo injertado con CDR. La deshumanización puede incluir restaurar los residuos de las regiones marco del anticuerpo donante al anticuerpo injertado con CDR, restaurando de esta manera el plegamiento apropiado. Una "deshumanización" similar puede conseguirse (i) incluyendo partes de la región marco "donante" en el anticuerpo "receptor" o (ii) injertando partes de la región marco del anticuerpo "donante" en el anticuerpo receptor (junto con las CDR injertadas del donante).

Para una discusión adicional de anticuerpos, anticuerpos humanizados, humanos preparados por ingeniería, y métodos para su preparación, véase Kontermann y Dubel, eds., *Antibody Engineering*, Springer, Nueva York, NY, 2001.

- 5 Los anticuerpos humanizados o humanos preparados por ingeniería ejemplares incluyen anticuerpos IgG, IgM, IgE, IgA, e IgD. Los presentes anticuerpos pueden ser de cualquier clase (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, etc.) o isotipo y pueden comprender una cadena ligera kappa o lambda. Por ejemplo, un anticuerpo humano puede comprender una cadena pesada IgG o fragmento definido, tal como al menos uno de los isotipos, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Como un ejemplo más, los presentes anticuerpos o fragmentos pueden comprender una cadena pesada IgG1 y una cadena ligera IgG1.
- 10 Los presentes anticuerpos y fragmentos pueden ser anticuerpos humanos, tales como anticuerpos que se unen a polipéptidos IL-1 β y están codificados por secuencias de ácido nucleico que son variantes somáticas naturales de secuencia de ácido nucleico de inmunoglobulina de línea germinal humana, y fragmentos, variantes sintéticas, derivados y fusiones de éstos. Dichos anticuerpos pueden producirse por cualquier método conocido en la técnica, tal como mediante el uso de mamíferos transgénicos (tales como ratones transgénicos) en los que el repertorio de inmunoglobulina nativo se ha reemplazado con genes V humanos en el cromosoma mamífero. Dichos mamíferos parecen llevar a cabo recombinación VDJ e hipermutación somática de los genes de anticuerpo de la línea germinal humana de una manera normal, produciendo así anticuerpos de afinidad alta con secuencias completamente humanas.
- 15 Los anticuerpos humanos dirigidos a proteína también pueden producirse usando animales transgénicos que no tienen producción de inmunoglobulina endógena y se modifican por ingeniería para contener loci de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, WO 98/24893 describe animales transgénicos que tienen un locus Ig humano en el que los animales no producen inmunoglobulinas endógenas funcionales debido a la inactivación de loci de cadena pesada y ligera endógenos. WO 91/00906 también describe huéspedes mamíferos no primates transgénicos capaces de montar una respuesta inmune a un inmunógeno, en el que los anticuerpos tienen regiones constantes y/o variables de primate, y en el que los loci que codifican inmunoglobulina endógena están sustituidos o inactivados. WO 96/30498 y la Patente U.S. No. 6.091.001 describe el uso del sistema Cre/Lox para modificar el locus de inmunoglobulina en un mamífero, para reemplazar toda o una parte de la región constante o variable para formar una molécula de anticuerpo modificada. WO 94/02602 describe huéspedes mamíferos no humanos que tienen loci Ig endógeno inactivados y loci Ig humanos funcionales. La Patente U.S. 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 más regiones constantes xenogénicas. Véase también, las Patentes U.S. Nos. 6.114.598, 6.657.103 y 6.833.268.
- 20 Usando un animal transgénico descrito anteriormente, puede producirse una respuesta inmune frente a una molécula antigénica seleccionada, y las células productoras de anticuerpo pueden retirarse del animal y usarse para producir hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos. Los protocolos de inmunización, adyuvantes, y semejantes son conocidos en la técnica, y se usan en la inmunización, por ejemplo, de un ratón transgénico como se describe en WO 96/33735. Esta publicación describe anticuerpos monoclonales frente a una variedad de moléculas antigénicas incluyendo IL-6, IL-8, TNF α , CD4 humano, L selectina, gp39, y toxina del tétanos. Los anticuerpos monoclonales pueden ensayarse para la capacidad de inhibir o neutralizar la actividad biológica o efecto fisiológico de la proteína correspondiente. WO 96/33735 describe que anticuerpos monoclonales frente a IL-8, derivados de células inmunes de ratones transgénicos inmunizados con IL-8, bloquearon las funciones inducidas por IL-8 de neutrófilos. Los anticuerpos monoclonales humanos con especificidad para el antígeno usado para inmunizar animales transgénicos también se describen en WO 96/34096 y en la solicitud de patente U.S. no. 20030194404; y en la solicitud de patente U.S. no. 20030031667.
- 25 Los animales transgénicos adicionales útiles para preparar anticuerpos monoclonales incluyen Medarex HuMAb-MOUSE®, descrito en la Pat. U.S. No. 5.770.429 y Fishwild, et al. (*Nat. Biotechnol.* 14: 845-851, 1996), que contiene secuencias de genes de genes de anticuerpo humano no reorganizados que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos humanos. La inmunización de un HuMAb-MOUSE® permite la producción de anticuerpos monoclonales completamente humanos frente a la proteína diana.
- 30 También, Ishida et al. (*Cloning Stem Cells*. 4: 91-102, 2002) describe el Ratón TransChromo (TCMOUSE™) que comprende segmentos de tamaño megabase de ADN humano y que incorpora el loci de inmunoglobulina humano completo (hlg). El TCMOUSE™ tiene un repertorio completamente diverso de hlg, incluyendo todas las subclases de IgG (IgG1-G4). La inmunización del TCMOUSE™ con varios antígenos humanos produce respuestas de anticuerpo que comprenden anticuerpos humanos.
- 35 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 la Pat. U.S. No. 5.591.669, Patente U.S. No. 5.589.369, Patente U.S. No. 5.545.807; y Publicación de Patente U.S. No. 20020199213. La Publicación de Patente U.S. No. 20030092125 describe métodos para sesgar la respuesta inmune de un animal frente al epítipo deseado. Los anticuerpos humanos también pueden generarse por células B activadas *in vitro* (véanse las Pat. U.S. Nos. 5.567.610 y 5.229.275).
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

Los anticuerpos humanos también pueden generarse mediante el cribado in vitro de bibliotecas de exposición 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 varias bibliotecas de exposición en fago que contienen anticuerpo y pueden prepararse fácilmente. Las bibliotecas pueden contener una diversidad de secuencias de anticuerpo humano, tales como fragmentos humanos Fab, Fv, y scFv, que pueden cribarse frente a una diana apropiada. Las bibliotecas de exposición en fago pueden comprender péptidos o proteínas distintas de anticuerpos que pueden cribarse para identificar agentes de unión selectivos de IL-1 β .

El desarrollo de tecnologías para preparar repertorios de genes de anticuerpo humano recombinantes, y la exposición de los fragmentos de anticuerpo codificados en la superficie de bacteriófagos filamentosos, ha proporcionado un medio para preparar anticuerpos humanos directamente. Los anticuerpos producidos por la tecnología del fago se producen como fragmentos de unión a antígeno -habitualmente fragmentos Fv o Fab- en bacterias y así carecen de funciones efectoras. Las funciones efectoras pueden introducirse por una de dos estrategias: Los fragmentos pueden prepararse por ingeniería bien en anticuerpos completos para expresión en células de mamífero, o en fragmentos de anticuerpo biespecífico con un segundo sitio de unión capaz de desencadenar una función efectora.

La invención contempla un método para producir un anticuerpo específico de diana o parte de unión a antígeno de éste que comprende las etapas de sintetizar una biblioteca de anticuerpos humanos en fago, cribar la biblioteca con proteína diana o una parte de ésta, aislar el fago que se une a la diana, y obtener el anticuerpo del fago. Como ejemplo, un método para preparar la biblioteca de anticuerpos para uso en las técnicas de exposición en fago comprende las etapas e inmunizar un animal no humano que comprende loci de inmunoglobulina humana con antígeno diana o una parte antigénica de éste para crear una respuesta inmune, extraer las células productoras de anticuerpo del animal inmunizado; aislar el ARN 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 exposición en fago de manera que los anticuerpos se expresen en el fago. Los anticuerpos específicos de diana recombinantes de la invención pueden obtenerse de esta manera.

Los procesos de exposición en fago mimetizan la selección inmune a través de la exposición de repertorios de anticuerpo en la superficie de bacteriófagos filamentosos, y la selección posterior de fagos por su unión a un antígeno elegido. Una de dichas técnicas se describe en WO 99/10494, que describe el aislamiento de anticuerpos agonistas con alta afinidad y funcionales para MPL y receptores msk usando una estrategia como ésta. Los anticuerpos de la invención pueden aislarse por cribado de una biblioteca combinatoria de anticuerpo recombinante, preferiblemente una biblioteca de exposición en fago de scFv, preparada usando los ADNc de V_L y V_H humana preparado a partir de ARNm derivado de linfocitos humanos. Las metodologías para preparar y cribar dichas bibliotecas se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente U.S. No. 5.969.108. Existen kits disponibles comercialmente para generar bibliotecas de exposición en fago (por ejemplo, el Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, no. de catálogo 27-9400-01; y el kit de exposición en fago Stratagene SurfZAP.TM. no. de catálogo 240612). También existen otros métodos y reactivos que pueden usarse para generar y cribar bibliotecas de exposición de anticuerpos (véase, por ejemplo, Ladner et al. Pat. U.S. No. 5.223.409; Kang et al. Publicación PCT No. WO 92/18619; Dower et al. Publicación PCT No. WO 91/17271; Winter et al. Publicación PCT No. WO 92/20791; Markland et al. Publicación PCT No. WO 92/15679; Breitling et al. Publicación PCT No. WO 93/01288; McCafferty et al. Publicación PCT No. WO 92/01047; Garrard et al. 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 para el antígeno diana con las características deseadas, se criba una biblioteca de V_H y V_L humanos para seleccionar fragmentos de anticuerpo que tienen la especificidad deseada. Las bibliotecas de anticuerpo usadas en este método son preferiblemente bibliotecas scFv preparadas y cribadas como se describe en la presente memoria y en la técnica (McCafferty et al., 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 anticuerpo scFv se criban preferiblemente usando proteína diana como el antígeno.

Alternativamente, el fragmento Fd (V_H-C_H1) y la cadena ligera (V_L-C_L) de anticuerpos se clonan separadamente por PCR y se recombinan aleatoriamente en bibliotecas combinatorias de exposición en fago, que pueden seleccionarse para unión a un antígeno particular. Los fragmentos Fab se expresan en la superficie de fagos, es decir, unidos físicamente a los genes que los codifican. Así, la selección de Fab por unión a antígeno co-selecciona las secuencias codificadoras de Fab, que pueden amplificarse posteriormente. Mediante varios ciclos de unión a antígeno y re-amplificación, un procedimiento denominado reconocimiento y selección, los Fab específicos para el antígeno se enriquecen y finalmente se aíslan.

En 1994, se describió una estrategia para la humanización de anticuerpos, denominada "selección guiada". La selección guiada utiliza el poder de la técnica de exposición en fago para la humanización de anticuerpo monoclonal de ratón (Véase Jespers, L. S., et al., *Bio/Technology* 12, 899-903 (1994)). Para esto, el fragmento Fd del anticuerpo

monoclonal de ratón puede exponerse en combinación con una biblioteca de cadena ligera humana, y la biblioteca Fab híbrida resultante puede seleccionarse con el antígeno. El fragmento Fd de ratón proporciona de esta manera un molde para guiar la selección. Posteriormente, las cadenas ligeras humanas seleccionadas se combinan con una biblioteca de fragmento Fd humana. La selección de la biblioteca resultante rinde Fab completamente humano.

5 Se ha descrito una variedad de procedimientos para derivar anticuerpos humanos de bibliotecas de exposición en fago (Véase, por ejemplo, Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991); Pat U.S. Nos. 5.565.332 y 5.573.905; Clackson, T., y Wells, J. A., *TIBTECH* 12, 173-184 (1994)). En particular, la selección y evolución in vitro de anticuerpos derivados de bibliotecas de exposición en fago se ha convertido en una herramienta potente (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); publicación de patente U.S. no. 20020004215 y WO 92/01047; publicación de patente U.S. no. 20030190317; y Patentes U.S. Nos. 6.054.287 y 5.877.293.

10 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 la publicación de patente U.S. no. 20030044772, publicada el 6 de marzo, 2003, describen métodos para cribar bibliotecas de anticuerpo expresados en fagos u otras moléculas de unión por levantamiento por captura, un método que implica la inmovilización de las moléculas de unión candidatas en un soporte sólido.

15 Los fragmentos Fv se exponen en la superficie del fago, por la asociación de una cadena expresada como una proteína de fusión de 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 filamentoso tal como uno de la clase I de fagos: fd, M13, f1, If1, 1ke, ZJ/Z, Ff y uno de la clase II de fagos Xf, Pf1 y Pf3. El fago puede ser M13, o fd o un derivado de éstos.

20 Una vez se han seleccionado los segmentos V_L y V_H humanos iniciales, se llevan a cabo experimentos de "mezclar y emparejar", en los que diferentes parejas de los segmentos V_L y V_H seleccionados inicialmente se criban para unión a diana, para seleccionar combinaciones de parejas V_L/V_H preferidas. Además, para mejorar más la calidad del anticuerpo, los segmentos V_L y V_H de la(s) pareja(s) V_L/V_H preferidas pueden mutarse aleatoriamente, preferiblemente en cualquiera de la región CDR1, CDR2 o CDR3 de V_H y/o V_L, en un proceso análogo al proceso de mutación somática in vivo responsable de la maduración por afinidad de los anticuerpos durante una respuesta inmune natural. Esta maduración por afinidad in vitro puede conseguirse amplificando las regiones V_L y V_H usando cebadores de PCR complementarios a CDR1, CDR2, y CDR3 de V_H, o CDR1, CDR2, y CDR3 de V_L, respectivamente, cebadores a los que se ha "añadido" una mezcla aleatoria de las cuatro bases de nucleótidos en determinadas posiciones de manera que los productos de PCR resultantes codifican segmentos V_L y V_H en los que se han introducido mutaciones aleatorias en las regiones CDR3 de V_H y/o V_L. Estos segmentos V_L y V_H mutados aleatoriamente pueden volver a cribarse para unión a antígeno diana.

25 Después del cribado y aislamiento de un anticuerpo específico de diana de una biblioteca de exposición de inmunoglobulina recombinante, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo seleccionado puede recuperarse del paquete de exposición (por ejemplo, del genoma del fago) y subclonarse en otros vectores de expresión por técnicas estándar de ADN recombinante. Si se desea, el ácido nucleico puede manipularse adicionalmente para crear otras formas de anticuerpo de la invención, como se describe más adelante. Para expresar un anticuerpo humano recombinante aislado por cribado de una biblioteca combinatoria, el ADN que codifica el anticuerpo se clona en un vector de expresión recombinante y se introduce en una célula huésped de mamífero, como se describe en la presente memoria.

30 Se contempla que el método de exposición en fago puede llevarse a cabo en una cepa mutadora de bacterias o célula huésped. Una cepa mutadora es una célula huésped que tiene un defecto genético que causa que el ADN replicado en ella esté mutado respecto a su ADN parental. Los ejemplos de cepas mutadoras son NR9046mutD5 y NR9046 mut T1.

35 También se contempla que el método de exposición en fago puede llevarse a cabo usando un fago auxiliar. Éste es un fago que se usa para infectar células que contienen un genoma de fago defectuoso y que funciona para complementar el defecto. El genoma de fago defectuoso puede ser un fagémido o un fago del que se han eliminado algunas secuencias de genes que codifican una función. Los ejemplos de fagos auxiliares son M13K07, M13K07 gen III no. 3; y fagos que exponen o codifican una molécula de unión fusionada con una proteína de la cápside.

40 Los anticuerpos también se generan mediante métodos de cribado de exposición en fago usando la estrategia combinatoria jerárquica dual como se describe en WO 92/01047 en la que una colonia individual que contiene bien un clon de cadena H o L se usa para infectar una biblioteca completa de clones que codifican la otra cadena (L o H) y el miembro de unión específico de dos cadenas resultante se selecciona según las técnicas de exposición en fago tales como las descritas allí. Esta técnica también se describe en Marks et al, *{Bio/Technology}*, 10: 779-783, 1992).

45 Los métodos para exponer péptidos en la superficie de células de levadura y microbianas también se han usado para identificar anticuerpos específicos de antígeno. Véase, por ejemplo, la Patente U.S. No. 6.699.658. Las

bibliotecas de anticuerpo pueden unirse a proteínas de levadura, tales como aglutinina, mimetizando eficazmente la exposición en la superficie de la célula de anticuerpos por las células B en el sistema inmune.

Además de los métodos de exposición en fago, los anticuerpos pueden aislarse usando métodos de exposición de ARNm en ribosomas y métodos de exposición en células microbianas. La selección del polipéptido usando la exposición en ribosomas se describe en Hanes et al., (*Proc. Natl Acad Sci. USA*, 94: 4937-4942, 1997) y en las Pat. U.S. Nos. 5.643.768 y 5.658.754 de Kawasaki. La exposición de ribosomas también es útil para el análisis mutacional rápido a gran escala de anticuerpos. La estrategia de mutagénesis selectiva también proporciona un método para producir anticuerpos con actividades mejoradas que pueden seleccionarse usando técnicas de exposición en ribosomas.

Los anticuerpos de unión a IL-1 (por ejemplo, IL-1 β) y fragmentos pueden comprender una o más partes que no se unen a IL-1 β pero que en lugar de esto son responsables de otras funciones, tales como vida media circulante, efecto citotóxico directo, marcaje detectable, o activación de la cascada endógena del complemento del receptor o citotoxicidad celular endógena. Los anticuerpos o fragmentos pueden comprender toda o una parte de la región constante y pueden ser de cualquier isotipo, incluyendo IgA (por ejemplo, IgA1 o IgA2), IgD, IgE, IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), o IgM. Además de, o en lugar de, comprender una región constante, los compuestos de unión a antígeno de la invención pueden incluir una etiqueta de epítipo, un epítipo de receptor salvaje, un resto de marcaje para propósitos de diagnóstico o purificación, o un resto citotóxico tal como una radionúclido o toxina.

La región constante (cuando está presente) de los presentes anticuerpos y fragmentos puede ser del tipo γ 1, γ 2, γ 3, γ 4, μ , β 2, o δ o ϵ , preferiblemente del tipo γ , más preferiblemente del tipo γ , mientras 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 la que la región Fc modificada comprende al menos una modificación de aminoácido respecto a una región Fc de tipo salvaje. La región Fc variante puede diseñarse, respecto a una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje, de manera que se una a receptores Fc con una afinidad mayor o menor.

Por ejemplo, los presentes anticuerpos de unión a IL-1 β y fragmentos pueden comprender una región Fc modificada. La región Fc se refiere a polipéptidos naturales o sintéticos homólogos al dominio C-terminal de IgG que se produce después de la digestión con papaína de IgG. Fc de IgG tiene un peso molecular de aproximadamente 50 kD. En los presentes anticuerpos y fragmentos, puede usarse una región Fc completa, o sólo una parte que aumenta la vida media. Además, son aceptables muchas modificaciones en la secuencia de aminoácidos, ya que la actividad nativa no es necesaria o deseada en todos los casos.

La región Fc puede mutarse, si se desea, para inhibir su capacidad de fijar el complemento y unirse al receptor Fc con alta afinidad. Para Fc IgG murina, la sustitución de residuos de Ala por Glu 318, Lys 320, y Lys 322 da lugar a que la proteína sea incapaz de dirigir ADCC. La sustitución de Glu por Leu 235 inhibe la capacidad de la proteína de unirse al receptor Fc con alta afinidad. También se conocen varias mutaciones para 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 el que una región Fc natural se modifica para incrementar la vida media del anticuerpo o fragmento en un entorno biológico, por ejemplo, la vida media en suero o una vida media medida por un ensayo *in vitro*. Los métodos para alterar la forma original de una región Fc de una IgG también se describen en la Patente U.S. No. 6.998.253.

En determinadas realizaciones, puede ser deseable modificar el anticuerpo o fragmento con el fin de incrementar su vida media en suero, por ejemplo, añadir moléculas tales como PEG u otros polímeros solubles en agua, incluyendo polímeros de polisacárido, a fragmentos de anticuerpo para incrementar la vida media. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítipo de unión de receptor salvaje en el fragmento de anticuerpo (por ejemplo, por mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o mediante la incorporación del epítipo en una etiqueta de péptido que se fusiona con el fragmento de anticuerpo bien al final o en el medio, por ejemplo, por síntesis de ADN o de péptidos) (véase la Publicación Internacional No. WO96/32478). El epítipo de unión de receptor salvaje 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 incrementar la vida media en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

Un epítipo de unión de receptor salvaje puede incluir una región en la que cualquiera de uno o más residuos de aminoácidos 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 de uno o dos bucles del dominio Fc. Aún más preferido, el epítipo de toma del dominio CH2 de la región Fc (por ejemplo, de una IgG) y se transfiere a la región CH1, CH3, o V_H, o más de una de dichas regiones, del anticuerpo. Alternativamente, el epítipo se toma del dominio CH2 de la región Fc y se transfiere a la región C_L o región V_L, o ambas, del fragmento de anticuerpo. Véanse las solicitudes internacionales WO 97/34631 y WO 96/32478 que describen variantes de Fc y su interacción con el receptor salvaje.

La mutación de residuos en los sitios de unión a receptor Fc pueden resultar en función efectora alterada, tal como actividad ADCC o CDC alterada, o vida media alterada. Las mutaciones potenciales incluyen inserción, delección o sustitución de uno o más residuos, incluyendo sustitución con alanina, una sustitución conservativa, una sustitución no conservativa, o el reemplazo con un residuo de aminoácido correspondiente en la misma posición de una subclase diferente de IgG (por ejemplo, reemplazo de un residuo de IgG1 con un residuo correspondiente de IgG2 en esa posición). Por ejemplo, se ha reportado que la mutación de serina en la posición de aminoácido 241 en IgG4 a prolina (encontrada en esa posición en IgG1 e IgG2) daba lugar a la producción de un anticuerpo homogéneo, así como una vida media en suero prolongada y mejoría de la distribución tisular comparado con la IgG4 quimérica original. (Angal *et al*, *Mol Immunol.* 30:105-8, 1993).

Los fragmentos de anticuerpo son partes de un anticuerpo intacto de longitud completa, tal como una región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; fragmentos divalentes; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única (por ejemplo, scFv); fragmentos de anticuerpo multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos, triespecíficos, y multiespecíficos (por ejemplo, fragmentos divalentes, trivalentes, tetravalentes): minicuerpos; anticuerpos recombinantes quelantes; tricuerpos o bicuerpos; intracuerpos; nanocuerpos; inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP), adnectinas, proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión; anticuerpos camelizados; anticuerpos que contienen V_{HH}; y cualquier otro polipéptido formado a partir de fragmentos de anticuerpo.

La presente invención incluye fragmentos de anticuerpo de unión a IL-1β que comprenden cualquiera de las secuencias de cadena pesada o ligera siguientes y que se unen a IL-1β. El término fragmentos tal y como se usa en la presente memoria se refiere a cualquiera de 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 y engloba fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y F(v), o las regiones variables de cadena ligera o pesada individuales o parte de éstas. Los fragmentos de unión 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 aclaran más rápidamente de la circulación, y pueden tener menos unión a tejido no específica que un anticuerpo intacto. Véase Wahl *et al.* (1983), *J. Nucl. Med.*, 24: 316-25. Estos fragmentos pueden producirse a partir de anticuerpos intactos usando métodos muy conocidos, por ejemplo por escisión proteolítica con enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂).

Los ensayos *in vitro* y basados en células están bien descritos en la técnica para uso en la determinación de la unión de IL-1β al receptor IL-1 de tipo I (IL-1RI), incluyendo ensayos que determinan en 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 de IL-1 de tipo I recombinante, incluyendo el receptor de IL-1 humano de tipo I, para dichos ensayos está disponible fácilmente de una variedad de fuentes comerciales (véase, por ejemplo R&D Systems, SIGMA). El receptor de IL-1 de tipo I también puede expresarse a partir de una construcción o vector de expresión introducido en una célula huésped apropiada usando técnicas estándar de biología molecular y transfección conocidas en la técnica. El receptor de IL-1 de tipo I expresado puede aislarse y purificarse para uso en ensayos de unión, o alternativamente usarse directamente en una forma asociada a célula.

Por ejemplo, la unión de IL-1β al receptor de IL-1 de tipo I puede determinarse inmovilizando un anticuerpo de unión a IL-1β, poniendo en contacto IL-1β con el anticuerpo inmovilizado y determinando si IL-1β está unido al anticuerpo, y poniendo en contacto una forma soluble de IL-1RI con el complejo IL-1β unido/anticuerpo y determinando si el IL-1RI soluble está unido al complejo. El protocolo también puede incluir poner en contacto el IL-1RI soluble con el anticuerpo inmovilizado antes del contacto con IL-1β, para confirmar que el IL-1RI soluble no se une al anticuerpo inmovilizado. Este protocolo puede llevarse a cabo usando un instrumento Biacore® para el análisis cinético de las interacciones de unión. Dicho protocolo también puede emplearse para determinar si un anticuerpo u otra molécula permite o bloquea la unión de IL-1β al receptor de IL-1 de tipo I.

Para otros ensayos de unión IL-1β/IL-1RI, el permitir o bloquear la unión de IL-1β al receptor IL-1 de tipo I puede determinarse comparando la unión de IL-1β a IL-1RI en presencia o ausencia de anticuerpos IL-1β o fragmentos de unión a IL-1β de éstos. El bloqueo se identifica en la lectura del ensayo como una reducción designada de la unión de IL-1β al receptor IL-1 de tipo I en presencia de anticuerpos anti-IL-1β o fragmentos de unión a IL-1β de éstos, comparado con una muestra control que contiene el tampón o diluyente correspondiente pero no un anticuerpo IL-1β o fragmento de unión a IL-1β de éste. La lectura del ensayo puede verse cualitativamente como que indica la presencia o ausencia de bloqueo, o puede verse cuantitativamente como que indica una reducción en porcentaje o número de veces de la unión debido a la presencia del anticuerpo o fragmento.

Alternativamente o adicionalmente, cuando un anticuerpo de unión a IL-1β o fragmento de unión a IL-1β bloquea sustancialmente la unión de IL-1β a IL-1RI, la unión de IL-1β 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 1.000 veces, alternativamente al menos aproximadamente 10.000 veces, o más, comparado con la unión de las mismas concentraciones de IL-1 β e IL-1RI en ausencia del anticuerpo o fragmento. Como otro ejemplo, cuando un anticuerpo de unión a IL-1 β o fragmento de unión a IL-1 β permite 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 fragmento.

En el contexto de la presente invención, se describen anticuerpos de unión a IL-1 β o fragmentos de unión a IL-1 β que se unen al mismo epítipo o sustancialmente el mismo epítipo que uno o más de los anticuerpos ejemplares descritos en la presente memoria. Alternativamente o adicionalmente, los anticuerpos de unión a IL-1 β o fragmentos de unión a IL-1 β compiten con la unión de un anticuerpo que tiene secuencias de región variable de AB7, descrito en la solicitud US número 11/472813 o WO 2007/002261 (secuencias mostradas más adelante). Como un ejemplo, cuando un anticuerpo de unión a IL-1 β o fragmento de unión a IL-1 β compete con la unión de un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, la unión de un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 a IL-1 β puede reducirse al menos aproximadamente 2 veces, alternativamente al menos aproximadamente 5 veces, alternativamente al menos aproximadamente 10 veces, alternativamente al menos aproximadamente 20 veces, alternativamente al menos aproximadamente 50 veces, alternativamente al menos aproximadamente 100 veces, alternativamente al menos aproximadamente 1.000 veces, alternativamente al menos aproximadamente 10.000 veces, o más, si la unión se mide en presencia del anticuerpo de unión a IL-1 β o fragmento de unión a IL-1 β . El anticuerpo de unión a IL-1 β o fragmento de unión a IL-1 β puede estar presente en exceso del anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, por ejemplo, un exceso de al menos aproximadamente 2 veces, alternativamente al menos aproximadamente 5 veces, alternativamente al menos aproximadamente 10 veces, alternativamente al menos aproximadamente 20 veces, alternativamente al menos aproximadamente 50 veces, alternativamente al menos aproximadamente 100 veces, alternativamente al menos aproximadamente 1.000 veces, alternativamente al menos aproximadamente 10.000 veces. Alternativamente o adicionalmente, la presente invención engloba anticuerpos de unión a IL-1 β y fragmentos que se unen a un epítipo contenido en la secuencia de aminoácidos ESDPKNYPKMKMEKRFVFNKIE (SEQ ID NO: 1), un epítipo al que se unen los anticuerpos designados AB5 y AB7 (solicitud US número 11/472813, WO 2007/002261). Como se contempla en la presente memoria, se puede determinar fácilmente si un anticuerpo de unión a IL-1 β o fragmento se une al mismo epítipo o sustancialmente el mismo epítipo que uno o más de los anticuerpos ejemplares, tales como por ejemplo el anticuerpo designado AB7, usando cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica.

Por ejemplo, los residuos de aminoácidos clave (epítipo) unidos por un anticuerpo de unión a IL-1 β o fragmento pueden determinarse usando una matriz de péptidos, tal como por ejemplo, una matriz de péptidos PepSpot™ (JPT Peptide Technologies, Berlín, Alemania), en el que se sintetiza un escaneo de doce péptidos de aminoácidos, que abarcan la secuencia de aminoácidos completa de IL-1 β , superponiéndose cada péptido por 11 aminoácidos al previo, directamente en una membrana. La membrana que porta los péptidos se ensaya con el anticuerpo para el que se busca la información de unión al epítipo, por ejemplo a una concentración de 2 μ g/ml, durante 2 hr a temperatura ambiente. La unión del anticuerpo a los péptidos unidos a la membrana puede detectarse usando un anticuerpo secundario de cabra anti-humano (o ratón, cuando sea apropiado) conjugado con HRP, seguido de quimioluminiscencia amplificada (ECL). La(s) mancha(s) de péptidos correspondientes a residuos o secuencias de aminoácidos particulares de la proteína IL-1 β madura, y que son clasificados como positivos para la unión de anticuerpo, son indicativos del epítipo unido por el anticuerpo particular.

Alternativamente o además, pueden llevarse a cabo experimentos de competición de anticuerpo y dichos ensayos son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo o fragmento se une a un epítipo contenido en una secuencia de péptido que comprende los aminoácidos ESDPKNYPKMKMEKRFVFNKIE (SEQ ID NO: 1), que corresponde a los residuos 83-105 de la proteína IL-1 β madura, puede compararse un anticuerpo con especificidad desconocida con cualquiera de los anticuerpos ejemplares (por ejemplo, AB7) de la presente invención que se sabe que se unen a un epítipo contenido en esa secuencia. Los ensayos de competición de unión pueden llevarse a cabo, por ejemplo, usando un instrumento Biacore® para el análisis cinético de las interacciones de unión o por ELISA. En dicho ensayo, el anticuerpo con especificidad de epítipo desconocida se evalúa para su capacidad de competir para la unión frente al anticuerpo comparador conocido (por ejemplo, AB7). La competición para la unión a un epítipo particular se determina por una reducción en la unión al epítipo de IL-1 β de 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 comparador conocido (por ejemplo, AB7) y es indicativa de la unión a sustancialmente el mismo epítipo.

A la vista de la identificación en esta descripción de las regiones de unión de IL-1 β en los anticuerpos ejemplares y/o los epítipos reconocidos por los anticuerpos descritos, se contempla que pueden generarse anticuerpos adicionales

con características de unión similares y utilidad terapéutica o de diagnóstico similares a las realizaciones de esta descripción.

Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo incluyen fragmentos que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno, generalmente reteniendo la parte de unión a antígeno del anticuerpo. Está bien establecido que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede llevarse a cabo por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de partes de unión 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 único 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 única también están englobados en el término parte de unión a antígeno de un anticuerpo. Los anticuerpos de unión a IL-1 β y fragmentos de la presente invención también engloban dominios de unión derivados de CDR monovalentes o multivalentes, o monoméricos o multiméricos (por ejemplo, tetaméricos), con o sin un soporte (por ejemplo, soporte de proteína o carbohidrato).

Los presentes anticuerpos de unión a IL-1 β o fragmentos pueden ser parte de moléculas de inmunoadhesión mayores, formadas por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o parte de anticuerpo con una o más proteínas o péptidos diferentes. Los ejemplos de dichas moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región central de estreptavidina para preparar una molécula tetamérica 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 una etiqueta de polihistidina C-terminal para preparar moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S. M., et al. (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Los anticuerpos y fragmentos que comprenden moléculas de inmunoadhesión pueden obtenerse usando técnicas estándar de ADN recombinante, como se describe en la presente memoria. Las partes de unión a antígeno preferidas son dominios completos o parejas de dominios completos.

Los anticuerpos de unión a IL-1 β y fragmentos de la presente invención también engloban fragmentos de anticuerpo de dominio (dAb) (Ward et al, *Nature* 341: 544-546, 1989) que consisten en un dominio V_H. Los anticuerpos de unión a IL-1 β y fragmentos de la presente invención también engloban fragmentos divalentes, que son anticuerpos divalentes en los que los dominios V_H y V_L se expresan en una única cadena de polipéptido, pero usando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de esta manera a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véase por ejemplo 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 fragmentos divalentes pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

Los anticuerpos de unión a IL-1 β y fragmentos de la presente invención también engloban fragmentos de anticuerpo de cadena única (scFv) que se unen a IL-1 β . Un scFv comprende una región variable de cadena pesada (V_H) de anticuerpo unida de manera operativa a una región variable de cadena ligera (V_L) de anticuerpo en el que la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera, conjuntamente 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. Alternativamente, 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, por un conector sintético que permite prepararlos como una única cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (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).

Un scFv puede comprender opcionalmente además un conector de polipéptido entre la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera. Dichos conectores de polipéptido comprenden generalmente entre 1 y 50 aminoácidos, alternativamente entre 3 y 12 aminoácidos, alternativamente 2 aminoácidos. Un ejemplo de un péptido conector para conectar cadenas pesadas y ligeras en un scFv comprende la secuencia de 5 aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 2). Otros ejemplos comprenden una o más 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 conectores.

Los anticuerpos de unión a IL-1 β y fragmentos descritos en el contexto de la presente invención también engloban anticuerpos de cadena pesada (HCAb). Las excepciones a la estructura H₂L₂ de los anticuerpos convencionales ocurre en algunos isotipos de las inmunoglobulinas encontradas 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. Nat. Acad. Sci. USA* 95: 11804), y en el pez rata moteado (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 de unión a antígeno usando sólo regiones variables de cadena pesada, ya que estos anticuerpos funcionales son dímeros sólo de cadenas pesadas (referidos como "anticuerpos de cadena pesada" o "HCAb"), De acuerdo con esto, algunas realizaciones de los presentes anticuerpos de unión a IL-1 β y fragmentos

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 camellos, dromedarios y llamas (Hamers-Casterman *et al*, Nature 363: 446-448 (1993)). Los HCAb tienen un peso molecular de aproximadamente 95 kDa en lugar del peso molecular de aproximadamente 160 kDa de los anticuerpos IgG convencionales. Sus dominios de unión consisten sólo en dominios variables de cadena pesada, referidos frecuentemente como V_{HH} para distinguirlos de V_H convencional. Muyldermans *et al*, J. Mol. Recognit. 12: 131-140 (1999). El dominio variable de los anticuerpos de cadena pesada se refiere algunas veces como un nanocuerpo (Cortez-Retamozo *et al*, Cancer Research 64: 2853-57, 2004). Puede generarse una biblioteca de nanocuerpos a partir de un dromedario inmunizado como se describe en Conrath *et al*, {*Antimicrob Agents Chemother* 45: 2807-12, 2001) o usando métodos recombinantes.

Como el primer dominio constante (C_{H1}) está ausente (eliminado 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 de 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)). V_{HH} de camélidos se recombina según se ha indicado 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, la IgG1 de llama es un isotipo de anticuerpo convencional (H₂L₂) en el que V_H se recombina con una región constante que contiene dominios bisagra, CH1, CH2, y CH3, mientras IgG2 e IgG3 de llama son isotipos sólo de cadena pesada que carecen de dominios CH1 y que no contienen cadenas ligeras.

Aunque los HCAb están desprovistos de cadenas ligeras, tienen un repertorio de unión a antígeno. El mecanismo genético de generación de HCAb se revisa en Nguyen *et al*. Adv. Immunol 79: 261-296 (2001) y Nguyen *et al*, Immunogenetics 54: 39-47 (2002). Los tiburones, incluyendo el tiburón nodriza, presentan dominios V únicos monoméricos que contienen receptor de antígeno similares. Irving *et al*, J. Immunol. Methods 248: 31-45 (2001); Roux *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 11804 (1998).

Los V_{HH} comprenden fragmentos de unión a antígeno pequeños intactos (por ejemplo, fragmentos que tienen aproximadamente 15 kDa, 118-136 residuos). Se ha encontrado que los dominios V_{HH} de camélidos 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_{HH} son altamente solubles y más estables que los derivados correspondientes de los fragmentos scFv y Fab. Los fragmentos V_H han sido relativamente difíciles de producir en forma soluble, pero se pueden obtener mejoras en la solubilidad y unión específica cuando los residuos marco se alteran para ser más semejantes a V_{HH}. (Véase, por ejemplo, Reichman *et al*, J Immunol Methods 1999, 231: 25-38.) Los V_{HH} portan sustituciones de aminoácidos que los hacen más hidrofílicos y evitan una interacción prolongada con BiP (proteína de unión a la cadena pesada de inmunoglobulina), que normalmente se une a la cadena H en el Retículo Endoplásmico (ER) durante el plegamiento y ensamblaje, hasta que es desplazada por la cadena L. Debido a la hidrofílicidad incrementada de los V_{HH}, se mejora la secreción del ER.

Pueden obtenerse V_{HH} funcionales por escisión proteolítica de HCAb de un camélido inmunizado, por clonación directa de genes V_{HH} de células B de un camélido inmunizado que resultan en V_{HH} recombinantes, o a partir de bibliotecas sin estimular o sintéticas. Los V_{HH} con especificidad de antígeno deseada también pueden obtenerse mediante metodología de exposición en fago. El uso de los V_{HH} en exposición en fago es mucho más sencillo y más eficaz comparado con Fab o scFv, ya que sólo se necesita clonar y expresar un dominio para obtener un fragmento de unión a antígeno funcional. 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 las Publicaciones de Patente U.S. Nos. 20050136049 y 20050037421.

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

Otras realizaciones proporcionan moléculas semejantes a V_{HH} mediante el proceso de camelización, mediante la modificación de V_H no de *Camelidae*, tal como V_{HH} humanas, para mejorar su solubilidad y evitar la unión no específica. Esto se consigue reemplazando residuos en el lado V_L de los V_H con residuos semejantes a V_{HH}, mimetizando de esta manera los fragmentos V_{HH} más solubles. Se espera que los fragmentos V_H camelizados, particularmente aquellos basados en el marco humano, presenten una respuesta inmune altamente reducida cuando se administran in vivo a un paciente y, de acuerdo con esto, se espera que tengan ventajas significativas 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).

Está disponible una amplia variedad de sistemas de expresión para la producción de fragmentos IL-1 β incluyendo fragmentos Fab, scFv, y V_{HH}. Por ejemplo, pueden usarse sistemas de expresión de origen tanto procarionota como eucariota para la producción a gran escala de fragmentos de anticuerpo y proteínas de fusión de anticuerpo. Son

particularmente ventajosos los sistemas de expresión que permiten la secreción de grandes cantidades de fragmentos de anticuerpo en el medio de cultivo.

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 Technol Biomed Life Sci.* 786: 161-76, 2003). Para los bicuerpos o tricuerpos, una molécula scFv se fusiona con una o ambas de las cadenas VL-CL (L) y VH-CH₁ (Fd), por ejemplo, para producir un tricuerpo se fusionan dos scFv al extremo C de Fab mientras en un bicuerpo una scFv se fusiona con el extremo C de Fab. Un "minicuerpo" que consiste en scFv fusionada con CH3 mediante un conector de péptido (sin bisagra) o mediante una bisagra IgG se ha descrito en Olafsen, et al, *Protein Eng Des Sel.* 2004 Abr; 17(4): 315-23.

Los intracuerpos son anticuerpos de cadena única que demuestran expresión intracelular y pueden manipular la función de 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 señal celulares que retienen la construcción de anticuerpo en regiones intracelulares, pueden producirse como se describe en Mhashilkar et al (*EMBO J* 14: 1542-51, 1995) y Wheeler et al. (*FASEB J.* 17: 1733-5. 2003). Los transcuerpos son anticuerpos permeables para la célula en los que un dominio de transducción de proteína (PTD) se fusiona con anticuerpos de fragmento variable de cadena única (scFV) Heng et al, (*Med Hypotheses.* 64: 1105-8, 2005).

Los anticuerpos de unión a IL-1 β y fragmentos descritos en el contexto de la presente invención también engloban anticuerpos que son SMIP o proteínas de fusión de dominio de unión de inmunoglobulina específicas para la proteína diana. Estas construcciones son polipéptidos de cadena única que comprenden dominios de unión a antígeno fusionados con dominios de inmunoglobulina necesarios para llevar a cabo las funciones efectoras del anticuerpo. Véase, por ejemplo, WO03/041600, Publicación de patente U.S. 20030133939 y Publicación de Patente US 20030118592.

Los anticuerpos de unión a IL-1 β y fragmentos descritos en el contexto de la presente invención también engloban inmuno adhesinas. Una o más CDR pueden incorporarse en una molécula bien covalentemente o no covalentemente para hacerla una inmuno adhesina. Una inmuno adhesina puede incorporar la o las CDR como parte de una cadena de polipéptido mayor, pueden unir covalentemente la o las CDR a otra cadena de polipéptido, o pueden incorporar la o las CDR no covalentemente. Las CDR descritas en la presente memoria permiten a la inmuno adhesina unirse específicamente a IL-1 β .

Los anticuerpos de unión a IL-1 β y fragmentos de la presente invención también engloban miméticos de anticuerpo que comprenden una o más partes de unión a IL-1 β construidas en un soporte orgánico o molecular (tal como un soporte de proteína o carbohidrato). Las proteínas que tienen estructuras tridimensionales relativamente definidas, referidas comúnmente como soportes de proteína, pueden usarse como reactivos para el diseño de miméticos de anticuerpo. Estos soportes contienen típicamente una o más regiones que son susceptibles de variación de secuencia específica o aleatoria, y dicha aleatorización de secuencia se lleva a cabo frecuentemente para producir bibliotecas de proteínas de las que pueden seleccionarse los productos deseados. Por ejemplo, un mimético de anticuerpo puede comprender un polipéptido de unión no inmunoglobulina quimérico que tiene un soporte que contiene un dominio semejante a inmunoglobulina que tiene dos o más bucles expuestos a disolvente que contienen una CDR diferente de un anticuerpo parental insertado en cada uno de los bucles y que presenta actividad de unión selectiva frente a un ligando unido por el anticuerpo parental. Los soportes de proteína no inmunoglobulina se han propuesto para obtener proteínas con nuevas propiedades de unión (Tramontano et al, *J. Mol. Recognit.* 7: 9, 1994; McConnell y Hoess, *J. Mol. Biol.* 250: 460, 1995). Se han ensayado otras proteínas como marcos y se han usado para exponer residuos aleatorizados en superficies de hélice alfa (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 constreñidos por puentes disulfuro, tales como aquellos 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 anticuerpo se describen en la Patente US 5.770.380 y Publicaciones de Patente US 2004/0171116, 2004/0266993, y 2005/0038229.

En el contexto de la presente invención los anticuerpos IL-1 β o fragmentos de anticuerpo que se describen para uso según la invención se unen generalmente a IL-1 β humano con alta afinidad (por ejemplo, según se determina con BIACORE), tal como por ejemplo con una constante de disociación de unión en equilibrio (K_D) para IL-1 β de aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 5 nM o menos, aproximadamente 1 nM o menos, aproximadamente 500 pM o menos, o más preferiblemente aproximadamente 250 pM o menos, aproximadamente 100 pM o menos, aproximadamente 50 pM o menos, aproximadamente 25 pM o menos, aproximadamente 10 pM o menos, aproximadamente 5 pM o menos, aproximadamente 3 pM o menos, aproximadamente 1 pM o menos, aproximadamente 0,75 pM o menos, aproximadamente 0,5 pM o menos, o aproximadamente 0,3 pM o menos. La constante de disociación puede medirse usando Biacore (GE Healthcare), y la medida usando Biacore puede preferirse cuando la constante de disociación es mayor de aproximadamente 10 pM. Alternativamente o además, la constante de disociación puede medirse usando KinExA (Sapidyne Instruments, Inc), y la medida usando KinExA puede preferirse cuando la constante de disociación es menor de aproximadamente 10 pM.

Los anticuerpos o fragmentos descritos en el contexto de la presente invención, pueden unirse, por ejemplo, a IL-1 β con una CI_{50} de aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 5 nM o menos, aproximadamente 2 nM o menos, aproximadamente 1 nM o menos, aproximadamente 0,75 nM o menos, aproximadamente 0,5 nM o menos, aproximadamente 0,4 nM o menos, aproximadamente 0,3 nM o menos, o incluso aproximadamente 0,2 nM o menos, según se determina por el ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzima (ELISA). Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención no reacciona de manera cruzada con ninguna otra diana distinta de IL-1. Por ejemplo, los anticuerpos y fragmentos descritos en el contexto de la presente invención pueden unirse a IL-1 β , pero no se unen detectablemente a IL-1 α , o tienen al menos aproximadamente 100 veces (por ejemplo, al menos aproximadamente 150 veces, al menos aproximadamente 200 veces, o incluso al menos aproximadamente 250 veces) mayor selectividad en su unión a IL-1 β respecto a su unión a IL-1 α . Los anticuerpos o fragmentos descritos según la presente invención pueden, en determinadas realizaciones, inhibir la expresión de IL-6 sérica inducida por IL-1 β en un animal por al menos 50% (por ejemplo, al menos 60%, al menos 70%, o incluso al menos 80%) comparado con el nivel de IL-6 sérica en un animal estimulado con IL-1 β al que no se ha administrado un anticuerpo o fragmento de la invención. Los anticuerpos pueden unirse a IL-1 β pero permitir o permitir sustancialmente la unión del ligando IL-1 β unido al receptor IL-1 tipo I (IL-1RI). A diferencia de muchos anticuerpos conocidos de unión a IL-1 β que bloquean o interfieren sustancialmente con la unión de IL-1 β a IL-1RI, los anticuerpos designados AB5 y AB7 (solicitud US número 11/472813, WO 2007/002261) se unen selectivamente al ligando IL-1 β , pero permiten la unión del ligando IL-1 β unido a IL-1RI. Por ejemplo, el anticuerpo designado AB7 se une a un epítipo de IL-1 β pero aún así permite al IL-1 β unido unirse a IL-1RI. En determinadas realizaciones, el anticuerpo puede disminuir la afinidad de la interacción de IL-1 β unido para unirse a IL-1RI. De acuerdo con esto, la invención proporciona, en un aspecto relacionado, el uso de un anticuerpo de unión a IL-1 β o fragmento de anticuerpo de unión a IL-1 β que tiene al menos una de las características mencionadas anteriormente. Cualquiera de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o polipéptidos de la invención anteriores puede humanizarse o prepararse por ingeniería humana, como se describe en la presente memoria.

Según la invención, AB7 (solicitud US número 11/472813, WO2007/002261) puede usarse según la invención. La solicitud US número 11/472813 y WO2007/002261 también describen AB5. Las secuencias de la región variable de AB5 y AB7 (también referido como XOMA 052) son como sigue:

AB5*CADENA LIGERA*

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLSWYQQKPDGTVKLLIYYTSKLHS

GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCLQGKMLPWTFGGGKLEIK (SEQ

30 ID NO: 3)

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

CADENA PESADA

QVTLKESGPGILKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPSGKGLEWLAHIWW

DGDESYNPSLKTQLTISKDTSRNQVFLKITSVDTVDTATYFCARNRYDPPWFVD

WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 4)

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

35 **AB7**

CADENA LIGERA

DIQMTQSTSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLSWYQQKPGKAVKLLIYYTSKLH

SGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQQEDFATYFCLQGKMLPWTFGQGKLEIK

(SEQ ID NO: 5)

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

CADENA PESADA

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAHIW
WDGDESYNPSLKSRLTISKDTSKNQVSLKITSVTAADTAVYFCARNRYDPPWFV

DWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 6)

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

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo descritos en la presente memoria pueden prepararse por cualquier método adecuado. Los métodos adecuados para preparar dichos anticuerpos y fragmentos de anticuerpo son conocidos en la técnica. Otros métodos para preparar los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo son como se describe en la presente memoria como parte de la invención. El anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o polipéptido de la invención, como se describe en la presente memoria, puede aislarse o purificarse hasta cualquier grado. Tal y como se usa en la presente memoria, un compuesto aislado es un compuesto que se ha retirado de su entorno natural. Un compuesto purificado es un compuesto cuya pureza se ha incrementado, de manera que el compuesto existe en una forma que es más pura de la que existe (i) en su entorno natural o (ii) cuando se sintetiza y/o amplifica inicialmente en condiciones de laboratorio, en las que "pureza" es un término relativo y no significa necesariamente "pureza absoluta".

Composiciones Farmacéuticas

Los anticuerpos de unión a IL-1 (por ejemplo, IL-1 β) y fragmentos de anticuerpo para uso según la presente invención pueden formularse en composiciones, especialmente composiciones farmacéuticas, para uso en los métodos de la presente memoria. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo de unión a IL-1 β o fragmento de anticuerpo de la invención mezclado con un vehículo adecuado, por ejemplo, un agente farmacéuticamente aceptable. Típicamente, los anticuerpos de unión a IL-1 β y fragmentos de anticuerpo de la invención están lo suficientemente purificados para administración a un animal antes de la formulación en una composición farmacéutica.

Los agentes farmacéuticamente aceptables incluyen vehículos, excipientes, diluyentes, antioxidantes, conservantes, colorantes, agentes saporíferos y diluyentes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, disolventes, materiales de relleno, agentes de volumen, tampones, vehículos de administración, agentes de tonicidad, codisolventes, agentes humectantes, agentes acomplejantes, agentes tamponadores, antimicrobianos, y tensioactivos.

La disolución salina tamponada neutra o disolución salina mezclada con albúmina son vehículos ejemplares apropiados. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween, plurónicos, o polietilén glicol (PEG). También como ejemplo, los agentes potenciadores de la tonicidad adecuados incluyen haluros de metal alcalino (preferiblemente cloruro de sodio o potasio), manitol, sorbitol, y semejantes. Los conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio, timerosal, fenil alcohol, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico y semejantes. El peróxido de hidrógeno también puede usarse como conservante. Los codisolventes adecuados incluyen glicerina, propilén glicol, y PEG. Los agentes acomplejantes 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 semejantes. Los tampones pueden ser tampones convencionales tales como acetato, borato, citrato, fosfato, bicarbonato, o Tris-HCl. El tampón acetato puede tener aproximadamente un pH 4-5,5, y el tampón Tris puede tener aproximadamente un pH 7-8,5. Los agentes farmacéuticos adicionales se muestran en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18^a Edición, A.R. Genaro, ed., Mack Publishing Company, 1990.

La composición puede estar en forma líquida o en una forma liofilizada o secada por congelación y puede incluir uno o más lioprotectores, excipientes, tensioactivos, aditivos estructurales de alto peso molecular y/o agentes de volumen (véase por ejemplo las Patentes US 6.685.940, 6.566.329, y 6.372.716). En una realización, se incluye un lioprotector, que es un azúcar no reductor tal como sacarosa, lactosa o trehalosa. La cantidad de lioprotector incluida generalmente es tal que, después de la reconstitución, la formulación resultante será isotónica, aunque las formulaciones hipertónicas o ligeramente hipotónicas también pueden ser adecuadas. Además, la cantidad de lioprotector debe ser suficiente para prevenir una cantidad inaceptable de degradación y/o agregación de la proteína después de la liofilización. Las concentraciones ejemplares de lioprotector para azúcares (por ejemplo, sacarosa, lactosa, trehalosa) en la formulación pre-liofilizada son de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 400 mM. En otra realización, se incluye un tensioactivo, tal como por ejemplo, tensioactivos no iónicos y tensioactivos iónicos tales como polisorbatos (por ejemplo, polisorbato 20, polisorbato 80); poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188); poli (etilen glicol) fenil éteres (por ejemplo, Tritón); dodecil sulfato de sodio (SDS); lauril sulfato de sodio; octil glicósido de sodio; lauril-, miristil-, linoleil-, o estearil-sulfobetaina; lauril-, miristil-, linoleil-, o estearil-sarcosina; linoleil-,

miristil-, o cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil-, o isostearamidopropil-betaína (por ejemplo, lauroamidopropil); miristarnidopropil-, palmidopropil-, o isostearamidopropil- dimetilamina; sodio metil cocoil-, o disodio metil ofeil-taurato; y la serie MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, NJ.), polietil glicol, polipropil glicol, y copolímeros de etilen y propilen glicol (por ejemplo, Plurónicos, PF68 etc). Las cantidades ejemplares de tensioactivo que pueden estar presentes en la formulación pre-lifilizada son de aproximadamente 0,001-0,5%. Los aditivos estructurales de alto peso molecular (por ejemplo, materiales de relleno, aglutinantes) pueden incluir por ejemplo, goma arábica, albúmina, ácido alginico, fosfato de calcio (dibásico), celulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa microcristalina, dextrano, dextrina, dextratos, sacarosa, tilosa, almidón pregelatinizado, sulfato de calcio, amilosa, glicina, bentonita, maltosa, sorbitol, etilcelulosa, hidrógeno fosfato de disodio, fosfato de disodio, piro-sulfito de disodio, polivinil alcohol, gelatina, glucosa, goma de guar, glucosa líquida, azúcar compresible, silicato de magnesio y aluminio, maltodextrina, óxido de polietileno, polimetacrilatos, povidona, alginato de sodio, goma de tragacanto, celulosa microcristalina, almidón, y zeína. Las concentraciones ejemplares de aditivos estructurales de alto peso molecular son de 0,1% a 10% en peso. En otras realizaciones, puede incluirse un agente de volumen (por ejemplo, manitol, glicina).

Las composiciones pueden ser adecuadas para administración parenteral. Las composiciones ejemplares son adecuadas para inyección o infusión en un animal por cualquier ruta disponible para el experto en la técnica, tal como rutas intraarticular, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intralesional, intrarectal, transdérmica, e inhalada. Una formulación parenteral será típicamente una disolución acuosa isotónica estéril, sin pirógenos, que contiene opcionalmente conservantes farmacéuticamente aceptables.

Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilen glicol, polietilén glicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones emulsionales o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo disolución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer con lactosa, o aceites fijados. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluido y nutrientes, reponedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer, y semejantes. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como por ejemplo, anti-microbianos, anti-oxidantes, agentes quelantes, gases inertes y semejantes. Véase generalmente, Remington's Pharmaceutical Science, 16ª Ed., Mack Eds., 1980.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden formularse para administración controlada o sostenida de una manera que proporcione concentraciones locales del producto (por ejemplo, bolo, efecto liberación lenta) liberación sostenida y/o estabilidad incrementada o vida media en un entorno local particular. La invención contempla que en determinadas realizaciones dichas composiciones pueden incluir una cantidad significativamente mayor de anticuerpo o fragmento en el depósito inicial, mientras la cantidad eficaz de anticuerpo o fragmento liberada realmente y disponible en cualquier punto de tiempo es según la descripción de la presente memoria una cantidad mucho menor que el depósito inicial. Las composiciones pueden incluir la formulación de anticuerpos de unión a IL-1 β , fragmentos de anticuerpo, ácidos nucleicos, o vectores de la invención con preparaciones en partículas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc., así como agentes tales como una matriz biodegradable, microesferas inyectables, partículas en microcápsulas, microcápsulas, lechos de partículas bioerosionables, liposomas, y dispositivos de administración implantables que proporcionan la liberación controlada o sostenida del agente activo que puede administrarse como una inyección de liberación lenta. Las técnicas para formular dichos medios de administración sostenida o controlada son conocidos y se ha desarrollado y usado una variedad de polímeros para la liberación y administración controlada de fármacos. Dichos polímeros son típicamente biodegradables y biocompatibles. Los hidrogeles de polímero, incluyendo los formados por la formación de complejos de segmentos de polímero enantiomérico o de polipéptido, e hidrogeles con propiedades sensibles a la temperatura o pH, pueden ser deseables para proporcionar un efecto de liberación lenta de fármaco debido a las condiciones suaves y acuosas implicadas en atrapar agentes proteicos bioactivos (por ejemplo, anticuerpos). Véase, por ejemplo, la descripción de micropartículas poliméricas porosas de liberación controlada para la administración de composiciones farmacéuticas en la Publicación de Solicitud PCT WO 93/15722.

Los materiales adecuados para este propósito incluyen poliláctidos (véase, por ejemplo, la Patente U.S. 3.773.919), polímeros de poli-(α -ácidos hidroxicarboxílicos), tales como ácido poli -D(-)-3-hidroxibutírico (EP 133,988A), 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)), etilen vinil acetato, o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Otros polímeros biodegradables incluyen poli(lactonas), poli(acetales), poli(ortoésteres), y poli(ortocarbonatos). Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas, que pueden prepararse por 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 mismo, o sus productos de degradación, debe ser no tóxico en el tejido diana y no debe agravar más la afección. Esto puede determinarse por el cribado rutinario en modelos animales para el trastorno diana o, si dichos modelos no están disponibles, en animales normales.

La microencapsulación de proteínas recombinantes para liberación sostenida se ha llevado a cabo con éxito con la hormona de crecimiento humana (rhGH), interferón- (rhIFN--), interleuquina-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, eds, (Plenum Press: Nueva York, 1995), p. 439-462; WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; y Pat. U.S. No. 5.654.010. Las formulaciones de liberación sostenida de estas proteínas se desarrollaron usando polímero de ácido poli-láctico-coglicólico (PLGA) debido a su biocompatibilidad y amplio rango de propiedades biodegradables. Los productos de degradación de PLGA, ácidos láctico y glicólico pueden aclararse rápidamente en el cuerpo humano. Además, la degradabilidad 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 (Eds.), *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (Marcel Dekker: Nueva York, 1990), p. 1-41. Los ejemplos adicionales de composiciones de liberación sostenida incluyen, por ejemplo, EP 58.481 A, Pat. U.S. No. 3.887.699, EP 158.277 A, Patente Canadiense No. 1176565, U. Sidman et al., *Biopolymers* 22, 547 [1983], R. Langer et al., *Chem. Tech.* 12, 98 [1982], Sinha et al., *J. Control. Release* 90, 261 [2003], Zhu et al., *Nat. Biotechnol.* 18, 24 [2000], y Dai et al., *Colloids Surf B Biointerfaces* 41, 117 [2005].

Los polímeros bioadhesivos también están contemplados para uso en o con composiciones de la presente invención. Los bioadhesivos son materiales sintéticos y naturales capaces de adherirse a sustratos biológicos durante periodos de tiempo prolongados. Por ejemplo, Carbopol y policarbofilo son ambos derivados sintéticos entrecruzados de poli(ácido acrílico). Los sistemas de administración bioadhesivos basados en sustancias naturales 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 extracelular de tejido de vertebrados, incluyendo en tejidos conectivos, así como en el fluido sinovial y en el humor vítreo y acuoso del ojo. Los derivados esterificados del ácido hialurónico se han usado para producir microesferas para uso en la administración que son biocompatibles y biodegradables (véase, por ejemplo, Cortivo et al., *Biomaterials* (1991) 12: 727-730; Publicación Europea No. 517.565; Publicación Internacional No. WO 96/29998; Ilium et al., *J. Controlled Rel.* (1994) 29: 133-141). Las composiciones que contienen ácido hialurónico ejemplares de la presente invención comprenden un polímero de éster de ácido hialurónico en una cantidad de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 40% (p/p) de un anticuerpo de unión a IL-1 β o fragmento a polímero de ácido hialurónico.

Las matrices poliméricas tanto biodegradables como no biodegradables pueden usarse para administrar composiciones según la invención, y dichas matrices poliméricas pueden comprender polímeros naturales o sintéticos. Se prefieren las matrices biodegradables. El periodo de tiempo durante el cual se produce la liberación se basa en la selección del polímero. Típicamente, lo más deseable es la liberación durante un periodo que varía de entre una pocas horas y tres a doce meses. Los polímeros sintéticos ejemplares que pueden usarse para formar el sistema de administración biodegradable incluyen: polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, poliamidas, policarbonatos, poliaquilenos, polialquilen glicoles, polialquilen óxidos, polialquilen tereftalatos, polivinil alcoholes, polivinil éteres, polivinil ésteres, polivinil haluros, polivinilpirrolidona, poliglicólidos, polisiloxanos, polianhídridos, poliuretanos y co-polímeros de éstos, poli(ácido bórico), poli(ácido valérico), alquil celulosa, hidroxialquil celulosas, 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, celulosa acetato butirato, celulosa acetato ftalato, carboxietil celulosa, triacetato de celulosa, sulfato de celulosa sal de sodio, poli(metil metacrilato), poli(etil metacrilato), poli(butilmetacrilato), poli(isobutil metacrilato), poli(hexilmetacrilato), poli(isodecil metacrilato), poli(lauril metacrilato), poli(fenil metacrilato), poli(metil acrilato), poli(isopropil acrilato), poli(isobutil acrilato), poli(octadecil acrilato), polietileno, polipropileno, poli(etilen glicol), poli(etilen óxido), poli(etilen tereftalato), poli(vinil alcoholes), polivinil acetato, poli vinil cloruro, poliestireno y polivinilpirrolidona. Los polímeros naturales ejemplares incluyen alginato y otros polisacáridos que incluyen dextrano y celulosa, colágeno, derivados químicos de éstos (sustituciones, adiciones de grupos químicos, por ejemplo, alquilo, alquilenos, hidroxilaciones, oxidaciones, y otras modificaciones hechas rutinariamente por los expertos en la técnica), albúmina y otras proteínas hidrofílicas, zeína y otras prolaminas y proteínas hidrofóbicas, copolímeros y mezclas de éstos. En general, estos materiales se degradan bien por hidrólisis enzimática o exposición a agua in vivo, por erosión superficial o total. El polímero opcionalmente está en la forma de un hidrogel (véase por ejemplo, WO 04/009664, WO 05/087201, Sawhney, et al., *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587,) que puede absorber hasta aproximadamente 90% de su peso en agua y además, opcionalmente está entrecruzado con iones multi-valentes 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 mono-, di- y tri-glicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptido; recubrimientos de cera; comprimidos comprimidos usando aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y semejantes. Los ejemplos específicos incluyen, pero no están limitados a: (a) sistemas erosionales en los que el producto está contenido en una forma en una matriz tal como los descritos en las Pat. U.S. Nos. 4.452.775, 4.675.189 y 5.736.152 y (b) sistemas difusionales en los que un producto permea a una velocidad controlada de un polímero tal como los descritos en las Pat. U.S. Nos. 3.854.480, 5.133.974 y 5.407.686. Los liposomas que contienen el producto pueden prepararse por métodos conocidos, tales como por ejemplo (DE 3.218.121; Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688-3692 (1985); Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030-4034

(1980); EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949; EP 142.641; Solicitud de patente japonesa 83-118008; Pat. U.S. Nos. 4.485.045 y 4.544.545; y EP 102.324).

5 Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de unión a IL-1 β o fragmento puede formularse para inhalación, tal como por ejemplo, como un polvo seco. Las disoluciones de inhalación también pueden formularse en una propulente licuado para administración en aerosol. En otra formulación más, las disoluciones pueden nebulizarse. La composición farmacéutica adicional para administración pulmonar incluye aquellas descritas, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud PCT WO 94/20069, que describe la administración pulmonar de proteínas químicamente modificadas. Para la administración pulmonar, el tamaño de partícula debe ser adecuado para administración al pulmón distal. Por ejemplo, el tamaño de partícula puede ser de 1 μ m a 5 μ m; sin embargo, pueden usarse partículas mayores, por ejemplo, si cada partícula es bastante porosa.

10 Determinadas formulaciones que contienen anticuerpos de unión a IL-1 β o fragmentos de anticuerpo pueden administrarse oralmente. Las formulaciones administradas de esta manera pueden formularse con o sin los vehículos usados habitualmente en la formación de composiciones de formas de dosificación sólida tales como comprimidos y cápsulas. Por ejemplo, una cápsula puede diseñarse para liberar la parte activa de la formulación en el momento del tracto gastrointestinal cuando la biodisponibilidad se maximiza y la degradación pre-sistémica se minimiza. Pueden incluirse agentes adicionales para facilitar la absorción de un agente de unión selectivo. También pueden emplearse diluyentes, saporíferos, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes de disgregación de comprimidos, y aglutinantes.

15 Otra preparación puede implicar una cantidad eficaz de un anticuerpo de unión a IL-1 β o fragmento mezclada con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Mediante la disolución de comprimidos en agua estéril, u otro vehículo apropiado, pueden prepararse disoluciones en forma de dosis unitaria. Los excipientes adecuados incluyen, pero no están limitados a, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio 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.

20 Las formulaciones farmacéuticas adecuadas y/o preferidas pueden determinarse a la vista de la presente descripción y conocimiento general de la tecnología de la formulación, dependiendo de la ruta pretendida de administración, formato de administración, y dosificación deseada. Independientemente de la manera de administración, una dosis eficaz puede calcularse según el peso corporal, área superficial, o tamaño de órganos del paciente. 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 hace rutinariamente en la técnica y está en el ámbito de las tareas llevadas a cabo rutinariamente en la técnica. Las dosificaciones apropiadas pueden averiguarse a través del uso de datos apropiados de respuesta a la dosis.

25 Las formulaciones adicionales serán evidentes a la luz de la presente descripción, incluyendo formulaciones que implican anticuerpos de unión a IL-1 β y fragmentos en combinación con uno o más agentes terapéuticos diferentes. Por ejemplo, en algunas formulaciones, un anticuerpo de unión a IL-1 β , fragmento de anticuerpo, ácido nucleico, o vector de la invención se formula con un segundo inhibidor de una ruta de señalización de IL-1. Los segundos inhibidores representativos incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, péptidos, polipéptidos, compuestos, ácidos nucleicos, vectores y composiciones farmacéuticas, tales como, por ejemplo, las descritas en US 6899878, US 2003022869, US 20060094663, US 20050186615, US 20030166069, WO/04022718, WO/05084696, WO/05019259. Por ejemplo, una composición puede comprender un anticuerpo de unión a IL-1 β , fragmento de anticuerpo, ácido nucleico, o vector de la invención en combinación con otro anticuerpo de unión a IL-1 β , fragmento, o un ácido nucleico o vector que codifica dicho anticuerpo o fragmento.

30 Las composiciones farmacéuticas pueden comprender anticuerpos de unión a IL-1 β o fragmentos en combinación con otros agentes activos. Dichas combinaciones son aquellas útiles para su propósito pretendido. Las combinaciones que son parte de esta invención pueden ser anticuerpos de unión a IL-1 β y fragmentos, tales como por ejemplos los descritos en la presente memoria, y al menos un agente adicional. Los ejemplos de agentes activos que pueden usarse en combinación mostrados más adelante son ilustrativos para los propósitos y no se pretende que estén limitados. 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 llevar a cabo su función pretendida.

35 La invención contempla además que las composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más agentes activos diferentes pueda administrarse separadamente de los anticuerpos de unión a IL-1 β o fragmentos, y dichas administraciones separadas pueden llevarse a cabo en el mismo punto de tiempo o diferentes, tal como por ejemplo el mismo o días diferentes. La administración de los demás agentes activos puede ser según las prácticas médicas estándar conocidas en la técnica, o la administración puede modificarse (por ejemplo, intervalos más largos, dosificaciones menores, inicio retrasado) cuando se usa conjuntamente con la administración de anticuerpos de unión a IL-1 β o fragmentos, tales como los descritos en la presente memoria.

40 Los agentes activos o combinaciones con los presentes anticuerpos o fragmentos incluyen indometacina, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAID) tales como aspirina, ibuprofeno, y otros derivados del ácido propiónico (alminoprofeno, benoxaprofeno, ácido buclóxico, carprofeno, fenbufeno, fenoprofeno, fluprofeno, flurbiprofeno,

indoprofeno, quetoprofeno, miroprofeno, naproxeno, oxaprozina, piroprofeno, pranoprofeno, suprofen, ácido tiaprofénico, y tioxaprofeno), derivados del ácido acético (indometacina, acemetacina, alclofenac, clidanac, diclofenac, fenclofenac, ácido fenclóxico, fentiazac, fuirofenac, ibufenac, isoxepac, oxpinac, sulindac, tiopinac, tolmetina, zidometacina, y zomepirac), derivados del ácido fenámico (ácido flufenámico, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido niflúmico y ácido tolfenámico), derivados del ácido bifenilcarboxílico (diflunisal y flufenisal), oxicams (isoxicam, piroxicam, sudoxicam y tenoxicam), salicilatos (ácido acetil salicílico, sulfasalazina) y las pirazonas (apazona, bezpiperilona, feprazona, mofebutazona, oxifenbutazona, fenilbutazona). Otras combinaciones incluyen inhibidores de ciclooxigenasa-2 (COX-2), acuaréticos, glucocorticoides orales, glucocorticoides intra-articulares, colchicina, inhibidores de xantina-oxidasa, alopurinol, agentes uricosúricos, sulfipirazona, febuxostat, probenecid, fenofibrato, benemid, antagonistas del receptor de angiotensina II, losartán, tiazidas, PEG-uricasa, bicarbonato de sodio, ácido etilendiaminotetraacético. Otros agentes activos para combinación incluyen esteroides tales como prednisolona, prednisona, metilprednisolona, betametasona, dexametasona, o hidrocortisona. Dicha combinación puede ser especialmente ventajosa, ya que uno o más efectos secundarios del esteroide pueden reducirse o incluso eliminarse reduciendo la dosis requerida de esteroide cuando se tratan pacientes en combinación con los presentes anticuerpos y fragmentos.

Se contempla además que un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento administrado a un sujeto según la invención puede administrarse en combinación con el 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 el al menos un agente activo se mantiene. En otra realización, el tratamiento con el al menos un agente activo se reduce o interrumpe (por ejemplo, cuando el sujeto está estable) durante el curso de tratamiento con el anticuerpo IL-1 β (por ejemplo, con el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento mantenido a un régimen de dosificación constante). En otra realización, el tratamiento con el al menos un agente activo se reduce o interrumpe (por ejemplo, cuando el sujeto está estable), y el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento se reduce (por ejemplo, dosis menor, dosificación menos frecuente, régimen de tratamiento más corto). En otra realización, el tratamiento con el al menos un agente activo se reduce o interrumpe (por ejemplo, cuando el sujeto está estable), y el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento se incrementa (por ejemplo, dosis mayor, dosificación más frecuente, régimen de tratamiento más largo). En otra realización más, el tratamiento con el al menos un agente activo se mantiene y el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento se reduce o interrumpe (por ejemplo, dosis menor, dosificación menos frecuente, régimen de tratamiento más corto). En otra realización más, el tratamiento con el al menos un agente activo y el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento se reducen o interrumpen (por ejemplo, dosis menor, dosificación menos frecuente, régimen de tratamiento más corto).

Las composiciones farmacéuticas usadas en la invención pueden incluir una cantidad terapéuticamente eficaz o una cantidad profilácticamente eficaz de los anticuerpos de unión a IL-1 β o fragmentos. Una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o parte de anticuerpo puede variar según factores tales como el estado patológico, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o parte de anticuerpo de incitar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o parte de anticuerpo se ve superada por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una cantidad profilácticamente eficaz se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado.

Una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de unión a IL-1 β o fragmento dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos tales como la indicación para la que se está usando la composición, la ruta de administración, y la afección del sujeto. Las composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz para tratar una afección relacionada con IL-1.

Métodos de Uso

Los anticuerpos anti-IL-1 β o fragmentos como se proporcionan en la presente memoria, en los que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, son para uso en el tratamiento y/o prevención de gota en un sujeto. Dichas estrategias pueden usarse para tratar un sujeto mamífero (por ejemplo, humano) que padece gota o para prevenir la aparición de la misma en un sujeto en riesgo.

Los términos "prevención", "prevenir", "que previene", "supresión", "suprime", "que suprime", "inhibir" e "inhibición" tal y como se usan en la presente memoria se refieren a un curso de acción (tal como la administración de un compuesto o composición farmacéutica) iniciado de una manera (por ejemplo, antes del inicio de un síntoma clínico de un estado patológico o afección) con el fin de prevenir, suprimir o reducir, bien temporalmente o permanentemente, el inicio de una manifestación clínica del estado patológico o afección. Dicha prevención, supresión o reducción no necesita ser absoluta para ser útil.

Los términos "tratamiento", "tratar" y "que trata" tal y como se usan en la presente memoria se refieren a un curso de acción (tal como la administración de un compuesto o composición farmacéutica) iniciado después del inicio de un síntoma clínico de un estado patológico o afección con el fin de eliminar, reducir, suprimir o mejorar, bien

temporalmente o permanentemente, una manifestación clínica o progresión del estado patológico o afección. Dicho tratamiento no necesita ser absoluto para ser útil.

5 El término "que necesita tratamiento" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un juicio realizado por un sanitario de que un paciente requiere o se beneficiará de tratamiento. Este juicio se hace tomando como base una variedad de factores que están en el ámbito de la experiencia del sanitario, pero que incluye el conocimiento de que el paciente está enfermo, o estará enfermo, como resultado de una afección que es tratable por un método o compuesto de la descripción.

10 El término "que necesita prevención" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un juicio realizado por un sanitario de que un paciente requiere o se beneficiará de prevención. Este juicio se hace tomando como base una variedad de factores que están en el ámbito de la experiencia del sanitario, pero que incluye el conocimiento de que el paciente está enfermo o enfermará, como resultado de una afección que es prevenible por un método o compuesto de la descripción.

15 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a una cantidad de un compuesto (por ejemplo, anticuerpo), bien solo o como parte de una composición farmacéutica, que es capaz de tener cualquier efecto positivo, detectable en cualquier síntoma, aspecto, o características de un estado patológico o afección cuando se administra a un paciente (por ejemplo, como una o más dosis). Dicho efecto no necesita ser absoluto para ser beneficioso.

20 En una realización, el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento, en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, se administra a un sujeto con gota y el sujeto también recibe al menos un otro tratamiento médicamente aceptado (por ejemplo, medicación, fármaco, terapéutico, agente activo) para la enfermedad, afección o complicación. En otra realización, el al menos un otro tratamiento médicamente aceptado para la enfermedad, afección o complicación se reduce o interrumpe (por ejemplo, cuando el sujeto está estable), mientras el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento se mantiene a un régimen de dosificación constante. En otra realización, el al menos un otro tratamiento médicamente aceptado para la enfermedad, afección o complicación se reduce o interrumpe (por ejemplo, cuando el sujeto está estable), y el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento se reduce (por ejemplo, dosis menor, dosificación menos frecuente, régimen de tratamiento más corto). En otra realización, el al menos un otro tratamiento médicamente aceptado para la enfermedad, afección o complicación se reduce o interrumpe (por ejemplo, cuando el sujeto está estable), y el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento se incrementa (por ejemplo, dosis mayor, dosificación más frecuente, régimen de tratamiento más largo). En otra realización más, el al menos un otro tratamiento médicamente aceptado para la enfermedad, afección o complicación se mantiene y el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento se reduce o interrumpe (por ejemplo, dosis menor, dosificación menos frecuente, régimen de tratamiento más corto). En otra realización más, el al menos un otro tratamiento médicamente aceptado para la enfermedad, afección o complicación y el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento se reducen o interrumpen (por ejemplo, dosis menor, dosificación menos frecuente, régimen de tratamiento más corto).

40 En los usos preferidos para tratar o prevenir gota, el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste, en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, se administra al sujeto según el número de dosis, cantidades por dosis y/o intervalos entre dosificaciones mencionados anteriormente. Alternativamente, el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento puede administrarse como una o más dosis iniciales de las cantidades mencionadas anteriormente que son menores que una o más cantidades de dosis posteriores. Al proporcionar la o las dosis iniciales en una cantidad menor, puede potenciarse la eficacia y/o tolerabilidad del tratamiento. Por ejemplo, en una realización no limitante de la invención, pueden administrarse una o más dosis iniciales (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5) de una cantidad de anticuerpo o 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), seguido de una o más dosis posteriores en una cantidad mayor que la o las dosis iniciales (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 invención contempla que cada dosis de anticuerpo o fragmento puede administrarse en uno o más sitios.

55 Los usos para tratar o prevenir una enfermedad o afección según la presente invención pueden usar un esquema pre-determinado o "rutinario" para la administración del anticuerpo o fragmento. Tal y como se usa en la presente memoria, un esquema rutinario se refiere a un periodo de tiempo designado predeterminado entre administraciones de dosis. El esquema rutinario puede englobar periodos de tiempo que son idénticos o que se diferencian en longitud, siempre que el esquema sea predeterminado. El esquema rutinario abarcará cualquier combinación particular siempre que se determine antes del momento en el que el esquema apropiado implique la administración en un día determinado.

60 La invención contempla además que los anticuerpos anti-IL-1 β o fragmentos, en los que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, usados según la invención proporcionada en la presente memoria, pueden administrarse

conjuntamente con más métodos de tratamiento y composiciones farmacéuticas tradicionales (por ejemplo, agentes activos). Dichas composiciones pueden incluir, por ejemplo, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAID), corticosteroides, hormona adrenocorticotrópica, y colchicinas. En determinadas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos usados según la invención pueden prevenir o retrasar la necesidad de métodos de tratamiento y composiciones farmacéuticas adicionales. En otras realizaciones, los anticuerpos o fragmentos pueden reducir la cantidad, frecuencia o duración de los métodos de tratamiento o composiciones farmacéuticas adicionales.

Alternativamente, los usos para tratar o prevenir una enfermedad o afección según la presente invención pueden usar un esquema para la administración del anticuerpo o fragmento que se basa en la presencia de síntomas de la enfermedad y/o cambios en cualquiera de las evaluaciones de la presente memoria como un medio para determinar cuándo administrar una o más dosis posteriores. De manera similar, esta estrategia puede usarse como un medio para determinar si debe incrementarse o disminuirse una dosis posterior, tomando como base el efecto de una dosis previa.

El diagnóstico de dichas enfermedades o afecciones en pacientes, o alternatively el riesgo de desarrollar dichas enfermedades o afecciones puede ser según las prácticas médicas estándar conocidas en la técnica. Después de la administración de un anticuerpo IL-1 β o fragmento, las evaluaciones clínicas para un efecto del tratamiento o preventivo en la gota son muy conocidas en la técnica y pueden usarse como un medio para monitorizar la eficacia de los métodos de la invención. Por ejemplo, la respuesta al tratamiento de gota puede evaluarse tomando como base una evaluación clínica del episodio de gota aguda que incluye una evaluación del médico que evalúa enrojecimiento, sensibilidad, e hinchazón (ninguna de las cuales es atribuible a otras causas), una evaluación global del médico, una auto-evaluación del dolor del sujeto, una evaluación del global del paciente, y/o un HAQ. En una realización, la eficacia del tratamiento se evalúa por una reducción en el 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 aparece en menos de aproximadamente 48 horas, menos de aproximadamente 36 horas, menos de aproximadamente 24 horas. La evaluación clínica de la gota aguda puede incluir uno o más de los componentes siguientes:

Evaluaciones del Médico:

- Evaluación Global del Médico (escala análoga de 10 puntos)
- Evaluación del médico de eritema (escala análoga de 10 puntos)
- Evaluación del médico de calor (escala análoga de 10 puntos)
- Evaluación del médico de hinchazón (escala análoga de 10 puntos)

Evaluaciones del Sujeto:

- Evaluación Global del Paciente (escala análoga de 10 puntos)
- Dolor en reposo (escala análoga de 10 puntos)
- Dolor con carga de peso/movimiento (escala análoga de 10 puntos)
- Cuestionario de Evaluación de Salud (HAQ)

También pueden determinarse uno o más puntos finales secundarios, tales como por ejemplo niveles de proteína C reactiva (CRP) y/o velocidad de sedimentación de eritrocitos (ESR) 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; alternatively una disminución de >20%, >30%, >40%, >50%, >60%, >70%, >80%, >90%, >95% de los pre-tratamiento es indicativa de efecto terapéutico. Una disminución en ESR de >20%, >30%, >40%, >50%, >60%, >70%, >80%, >90%, >95%, >98% de los niveles pre-tratamiento es indicativa de efecto terapéutico. La descripción proporciona un método para tratar gota en un sujeto (por ejemplo, sujeto humano), comprendiendo el método administrar (por ejemplo, en una cantidad terapéuticamente eficaz) un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste al sujeto, en el que la dosis del anticuerpo o fragmento es suficiente para conseguir al menos una reducción del 50% en el dolor articular y al menos una disminución del 20% en los niveles de CRP, al menos una disminución del 30% en los niveles de CRP, al menos una disminución del 40% en los niveles de CRP, al menos una disminución del 50% en los niveles de CRP, al menos una disminución del 60% en los niveles de CRP, al menos una disminución del 70% en los niveles de CRP, al menos una disminución del 80% en los niveles de CRP y/o al menos una disminución del 90% en los niveles de CRP. En una realización preferida, la dosis del anticuerpo o fragmento es suficiente para conseguir al menos una reducción del 50% en el dolor articular y al menos una disminución del 20% en ESR, al menos una disminución del 40% en ESR, al menos una disminución del 50% en ESR, al menos una disminución del 60% en ESR, al menos una disminución del 70% en ESR, al menos una disminución del 80% en ESR, y/o al menos una disminución del 90% en ESR.

La descripción también proporciona un uso para tratar gota en un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano), comprendiendo el uso administrar (por ejemplo, en una cantidad terapéuticamente eficaz) un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de éste al sujeto, en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 y en el que la dosis del anticuerpo o fragmento es suficiente para conseguir al menos una reducción del 50% en el dolor articular, al menos una disminución del 20% en los niveles de CRP y al menos una disminución del 20% en ESR. En una realización, la dosis del anticuerpo o fragmento es suficiente para conseguir al menos una reducción del 50% en el dolor articular, al menos una disminución del 30% en los niveles de CRP y una disminución del 30% en ESR. En otra realización, la dosis del anticuerpo o fragmento es suficiente para conseguir al menos una reducción del 50% en el dolor articular, al menos una disminución del 40% en los niveles de CRP y una disminución del 40% en ESR. En otra realización, la dosis del anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento es suficiente para conseguir al menos una reducción del 60% en el dolor articular, al menos una disminución del 20% en los niveles de CRP y al menos una disminución del 20% en ESR. En otra realización, la dosis del anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento es suficiente para conseguir al menos una reducción del 60% en el dolor articular, al menos una disminución del 40% en los niveles de CRP y al menos una disminución del 40% en ESR. En otra realización, la dosis del anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento es suficiente para conseguir al menos una reducción del 60% en el dolor articular, al menos una disminución del 50% en los niveles de CRP y al menos una disminución del 50% en ESR. En otra realización más, la dosis del anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento es suficiente para conseguir al menos una reducción del 70% en el dolor articular, al menos una disminución del 20% en los niveles de CRP y al menos una disminución del 20% en ESR. En otra realización, la dosis del anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento es suficiente para conseguir al menos una reducción del 70% en el dolor articular, al menos una disminución del 40% en los niveles de CRP y al menos una disminución del 40% en ESR. En otra realización, la dosis del anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento es suficiente para conseguir al menos una reducción del 70% en el dolor articular, al menos una disminución del 50% en los niveles de CRP y al menos una disminución del 50% en ESR. En una realización, los niveles de CRP pueden medirse por un ensayo ELISA de CRP ultrasensible. En otra realización, ESR puede medirse por un método de ensayo de ESR Westergren.

EJEMPLOS

Se pretende que los ejemplos siguientes meramente ilustren adicionalmente la práctica de la presente invención, pero no debe considerarse que limitan su alcance de ninguna manera.

EJEMPLO 1

30 Inhibición de IL-1 β usando un anticuerpo IL-1 β de alta afinidad en un ensayo *in vitro* basado en células, con la producción de IL-8 inducida por IL-1 como lectura

El efecto inhibitorio del anticuerpo específico de IL-1 β se comparó con un inhibidor no anticuerpo de la ruta IL-1, Kineret® (anakinra), que es un antagonista del receptor de IL-1 recombinante (IL-1Ra). Se recogió sangre periférica heparinizada fresca de donantes sanos. Se plaquearon 180 μ l de sangre completa en una placa de 96 pocillos y se incubó con varias concentraciones del anticuerpo AB7 (número de solicitud US 11/472.813, WO 2007/002261) y 100 pM rhIL-1 β . Para las muestras tratadas con Kineret®, se combinaron Kineret® y rhIL-1 β 1:1 antes de mezclarlo con la sangre. Las muestras se incubaron durante 6 horas a 37°C con 5% CO₂. Las células de la sangre completa se lisaron con 50 μ l de 2,5% Tritón X-100. La concentración de interleuquina-8 (IL-8) en los lisados aclarados se ensayó por ELISA (kit ELISA Quantikine IL-8 humana, R&D Systems) según las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de IL-8 en las muestras tratadas con AB7 y Kineret® se compararon con una muestra control tratada con anti-KLH control. Los resultados se muestran en la Fig. 1 y se resumen en la Tabla 6. CI₅₀ es la concentración de anticuerpo requerida para inhibir el 50% de IL-8 liberada por estimulación con IL-1 β .

Tabla 1

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

45 Estos resultados demuestran la potencia *in vitro* de AB7, según se mide por la inhibición de la liberación de IL-8 estimulada por IL-1 β . Los resultados que muestran mayor potencia comparado con Kineret® indican que el anticuerpo tendrá eficacia inhibitoria de IL-1 β *in vivo*.

EJEMPLO 2

50 Inhibición *in vivo* de la actividad biológica de IL-1 β humano usando anticuerpos específicos de IL-1 β , según se mide por el impacto en la liberación de IL-6 estimulada por IL-1 β

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

Los resultados se muestran en la Figura 2A. La capacidad para inhibir la actividad *in vivo* de IL-1 β se evaluó como una función de los niveles de IL-6 en suero estimulados por IL-1 β . Como se ilustra por la Figura 2A, los anticuerpos AB7 y AB5 fueron eficaces para inhibir la actividad *in vivo* de IL-1 β humano. Estos resultados también muestran que una única inyección de AB7 o AB5 puede bloquear la acción sistémica de la estimulación de IL-1 β y que dichos anticuerpos son útiles para la inhibición de la actividad de IL-1 β *in vivo*.

Se llevó a cabo un experimento similar para demostrar adicionalmente la capacidad de AB7 de neutralizar IL-1 β de ratón *in vivo*, para apoyar el uso de este anticuerpo en modelos de ratón de enfermedad. Se determinó que AB7 tiene una afinidad para IL-1 β humano que es \sim 10.000 veces mayor que la afinidad para IL-1 β de ratón, y una potencia *in vitro* en el ensayo D10.G4.1 que es \sim 1.000 veces mayor que para la IL-1 β de ratón. En el modelo de ratón C57BL/6 con lectura de IL-6, se inyectó a los ratones AB7 (3 ó 300 μ g) o vehículo PBS control i.p. 24 horas antes de una inyección s.c. de IL-1 β humano (Figura 2B, panel A) o de ratón (Figura 2B, panel B) (20 ng). La sangre se recogió 2 horas después y las muestras de suero se analizaron para niveles de IL-6 mediante ELISA. Estos datos muestran supresión máxima de niveles de IL-6 (\sim 75%) inducidos por IL-1 β humano a 3 μ g (panel A), mientras se demostró supresión submáxima de los niveles de IL-6 (\sim 50%) inducidos por IL-1 β de ratón con 300 μ g (panel B). Estos resultados son consistentes con la observación de una afinidad mucho mayor y potencia *in vitro* del anticuerpo AB7 para IL-1 β humano, comparado con IL-1 β de ratón. Además, los datos indican que este anticuerpo puede usarse para modelos de enfermedad en ratón *in vivo* con una dosis apropiada mayor de la que se necesitaría para el tratamiento de sujetos humanos, en el que el anticuerpo tiene una afinidad y potencia muy superior. En el caso de otros anticuerpos IL-1 β , tal como por ejemplo otros anticuerpos descritos y/o citados en la presente memoria, que no presentan una afinidad y potencia significativamente menor *in vitro* para IL-1 β de ratón, puede no ser necesario un ajuste de la dosis a niveles mayores en modelos de ratón.

EJEMPLO 3

Farmacocinética de un anticuerpo anti-IL-1 β después de la administración de una única dosis intravenosa o subcutánea a ratas

Para examinar el perfil farmacocinético, un anticuerpo IL-1 β designado AB7 se administró a ratas macho adultas como un bolo intravenoso (IV) en la vena de la cola a dosis de 0,1, 1,0, ó 10 mg/kg (Grupos 1, 2, y 3 respectivamente) o una dosis subcutánea (SC) entre los omóplatos del hombro a 1,0 mg/kg (Grupo 4). Se recogieron muestras de sangre mediante cánula en la vena yugular o el seno retro-orbital a tiempos especificados de hasta 91 días después de la dosificación. Las muestras de sangre se centrifugaron para obtener suero. Las muestras se analizaron para la concentración de anticuerpo anti-IL-1 β usando un ensayo ELISA basado en fosfatasa alcalina como sigue.

Se diluyó IL-1 β (Preprotech) a 0,5 μ g/mL en PBS y se añadieron 50 μ L de esta disolución a pocillos de placas de microtitulación Nunc-Immuno Maxisorp (VWR) y se incubó toda la noche a 2-8°C. La disolución de antígeno se retiró y se añadieron 200 μ L de tampón de bloqueo [1% albúmina de suero bovino (BSA) en 1X PBS que contenía 0,05% Tween 20] a todos los pocillos y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del bloqueo, los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado (1X PBS, que contenía 0,05% Tween 20). Los estándares, muestras y controles se diluyeron en diluyente de muestra (25% Suero de Rata en 1X PBS que contenía 1% BSA y 0,05% Tween 20). Se prepararon disoluciones estándar de anticuerpo anti-IL-1 β como diluciones seriadas de dos veces de 2.000 a 0,24 ng/mL. Cada replicado y dilución de los estándares, muestras y controles (50 μ L) se transfirieron a las placas de microtitulación bloqueadas y se incubó durante 1 hora a 37°C. Después de incubar, los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado. Se diluyó anticuerpo anti-IgG humana de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (H+L) (Southern Biotech Associates Inc., Birmingham, AL) 1/1.000 en diluyente de conjugado (1% BSA en 1X PBS que contenía 0,05% Tween 20). Se añadieron cincuenta μ L del conjugado diluido a todos los pocillos excepto los pocillos BLANCO, que recibieron 50 μ L de diluyente de conjugado solo. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C y todos los pocillos se lavaron 3 veces con tampón de lavado y 3 veces con agua desionizada. Se añadió el sustrato p-nitrofenilfosfato (1 mg/mL en 10% tampón dietanolamina, pH 9,8) a todos los pocillos y se permitió que se produjera el desarrollo de color durante 1 hora a temperatura ambiente, después de lo cual se añadieron 50 μ L de 1 N NaOH para parar la reacción. La absorbancia a 405 nm se determinó usando un Lector de Placas SPECTRAMax M2 (Molecular Devices, Menlo Park, CA) y se representó una curva estándar como A_{405} frente a ng/mL de estándar de anticuerpo. Se llevó a cabo un análisis de regresión y se determinaron las concentraciones para las muestras y controles por interpolación a partir de la curva estándar. El límite de cuantificación fue 40 ng/mL.

Como se muestra en la Figura 3, las concentraciones en suero declinaron bi-exponencialmente entre los grupos de dosis IV. Se llevó a cabo un análisis compartimental en los datos de animales individuales, 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 declinaron con una vida media en la fase alfa promedio de $0,189 \pm 0,094$ a $0,429 \pm 0,043$ días (4,54 a 10,3 horas) y una vida media en la 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 se incrementaron hasta un pico de $4,26 \pm 0,065$ $\mu\text{g/mL}$ en los 2-3 días, y declinó con una vida media de $2,59 \pm 0,25$ días.

EJEMPLO 4

10 Farmacocinética de un anticuerpo anti-IL-1 β después de la administración de una única dosis intravenosa a monos cinomolgus

15 Monos cinomolgus machos y hembras adultos recibieron el anticuerpo anti-IL-1 β designado AB7 como una única inyección de bolo intravenoso (IV) a dosis de 0,3, 3,0, ó 30 mg/kg. Se recogieron muestras de sangre de animales antes de la dosis, 5 minutos, 4 y 8 horas después de la dosis en el Día 1, y Días 2, 4, 8, 11, 15, 22, 29, 43 y 56. Las muestras se analizaron para la concentración de anticuerpo -IL-1 β usando un ensayo ELISA basado en fosfatasa alcalina como sigue.

20 Se diluyó una disolución de IL-1 β hasta 0,5 $\mu\text{g/mL}$ en PBS y se añadieron 50 μL de esta disolución a pocillos de placas de microtitulación Nunc-Immuno Maxisorp (VWR) y se incubó toda la noche a 2-8°C. La disolución de antígeno se retiró y se añadieron 200 μL de tampón de bloqueo [1% albúmina de suero bovino (BSA) en 1X PBS que contenía 0,05% Tween 20] a todos los pocillos y se incubó durante 1-4 horas a temperatura ambiente. Después del bloqueo, los pocillos de cada placa se lavaron tres veces con tampón de lavado (1X PBS, que contenía 0,05% Tween 20). Los estándares, muestras y controles se diluyeron en diluyente de muestra (2% Suero Normal de Cinomolgus (NCS) en 1X PBS que contenía 1% BSA y 0,05% Tween 20). Las disoluciones estándar de anti-IL-1 β se prepararon como diluciones seriadas de dos veces desde 8.000 ng/mL. Cada replicado y dilución de los estándares, muestras y controles (50 μL) se transfirieron a las placas de microtitulación bloqueadas y se incubó durante 1 hora a 37°C. Después de la incubación primaria, los pocillos se lavaron 3 veces con tampón de lavado y se añadieron 50 μL de rHL-1 beta biotinilado a todos los pocillos. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C. Los pocillos se lavaron 3 veces con tampón de lavado y una incubación terciaria con cincuenta μL de estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina diluida se añadió a todos los pocillos excepto los pocillos BLANCO, que recibieron 50 μL de diluyente solo. Las placas se incubaron durante 30 minutos a 37°C y todos los pocillos se lavaron 3 veces con tampón de lavado y 3 veces con agua desionizada. Se añadió el sustrato p-nitrofenilfosfato (1 mg/mL en 10% tampón dietanolamina, pH 9,8) a todos los pocillos. Se permitió que se produjera el desarrollo de color en oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente, después de lo cual se añadieron 50 μL de 1 N NaOH para parar la reacción. La absorbancia a 405 nm se determinó para todos los pocillos usando un Lector de Placas SPECTRAMax M2 (Molecular Devices, Menlo Park, CA). Se representó una curva estándar como A_{405} frente a ng/mL de estándar de anti-IL-1 β . Se llevó a cabo un análisis de regresión de 4 parámetros y se determinaron las concentraciones para las muestras y controles por interpolación a partir de la curva estándar. El límite de cuantificación fue 40 ng/mL.

40 Para los grupos de dosis única 0,3 y 3 mg/kg, los niveles séricos de anticuerpo anti-IL-1 β declinaron con una vida media en la fase alfa promedio de $9,40 \pm 2,00$, seguido de una vida media en la fase beta de $13,3 \pm 1,0$ días (Figura 5). En monos cinomolgus que recibieron una única inyección IV de 30 mg/kg, los niveles séricos de anticuerpo declinaron más rápidamente, con vida media en la fase alfa de $10,9 \pm 3,2$ horas, seguido de una vida media en la fase beta de $7,54 \pm 1,79$ días. También se llevó a cabo el modelado de los perfiles concentración en plasma-tiempo de las dosis 0,1, 0,3, 1 y 10 mg/kg administradas en intervalos de cinco meses y se muestra en la Figura 5.

Ejemplo 5

45 Inhibición de la producción de citoquina en sangre humana completa por un anticuerpo IL-1 β

50 La medición de las citoquinas en la 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. Habitualmente, los niveles de citoquinas se miden en suero, pero este método no mide necesariamente las citoquinas totales. Muchas citoquinas pueden estar en el interior de las células (intracelular). Además, la capacidad de una célula para producir una citoquina puede ser una información más útil que el nivel de la citoquina circulante.

Se usó un método para estimular sangre completa para determinar la producción de citoquinas y el efecto de tratar con un anticuerpo anti-IL-1 β . Se tomó sangre de pacientes en tubos heparinizados estériles y se añadieron 250 μL de la sangre completa a cada criotubo estéril de tapa naranja Corning de 4 mL dispuestos como sigue:

Serie control

55 Todos los tubos se pre-llenaron con 550 μL de RPMI. Al tubo 1 (control), se añadieron 200 μL de RPMI y a los tubos 2-10, se añadieron 100 μL de RPMI adicionales. A cada uno de los tubos 2-10, se añadieron 100 μL de diluciones de un anticuerpo anti-IL-1 β (AB7).

Serie de ensayo

Se dispuso una serie similar de diluciones de anticuerpo como se ha detallado anteriormente.

5 Todos los tubos se mezclaron bien usando un vórtex de 10 segundos. Los tubos de la Serie control A1-10 recibieron 100 μ l de RPMI adicionales, se agitaron con vórtex 10 segundos, la tapa de rosca se ajustó firmemente y los tubos se pusieron en un incubador. A los tubos de la Serie de ensayo B1-10, se añadieron 100 μ l de *Staphylococcus epidermidis* matados con calor (concentración final de 1:1.000 de preparación madre que resulta en una proporción bacteria:célula blanca de la sangre de 10:1), los tubos se agitaron con vórtex durante 10 segundos, se taparon y se pusieron en un incubador a 37°C. Después de 24 horas de incubación, los cultivos se lisaron todos con Tritón 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 descongelación y los niveles de citoquina se miden por ensayos ELISA de citoquina estándar para TNF α , IL-6, IFN γ , IL-8, IL-1 α , IL-1Ra e IL-1 β (R&D Systems, Minneapolis, MN).

15 Las citoquinas medidas en los tubos de la serie control, que contienen sólo medio de cultivo estéril y anticuerpo (cuando se indica), reflejan el nivel espontáneo de estimulación. En sujetos sanos, se encontraron niveles muy bajos de las distintas citoquinas cuando se mide después de 24 horas de incubación. En pacientes con enfermedades no tratadas, los niveles pueden ser mayores. Los tubos de la Serie de ensayo contenían además una cantidad definida de *Staphylococcus epidermidis* matados con calor, que estimula la producción de varias citoquinas. Si el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-1 β es eficaz, este se reflejará en una producción reducida de citoquinas.

20 Como se muestra en la Figura 6, el anticuerpo anti-IL-1 β de alta afinidad AB7 fue muy eficaz inhibiendo la producción de IL-1 β en sangre humana. En un promedio de tres muestras humanas, el anticuerpo inhibió la producción de IL-1 β inducida por *Staphylococcus epidermidis* un 50% a 0,1 pM y 75% a 3 pM. A 100 pM, la inhibición fue 100%. Se indujo interferón gamma (IFN γ) por *Staphylococcus epidermidis* y AB7 redujo IFN γ inducido por *Staphylococcus epidermidis* un 75% a 100 pM.

Ejemplo 6

25 **Farmacocinética de un anticuerpo anti-IL-1 β después de la administración de una única dosis intravenosa a seres humanos**

30 La farmacocinética de un anticuerpo IL-1 β que tiene las propiedades mencionadas anteriormente se demostró en un estudio clínico en seres humanos de fase I. Específicamente, se llevó a cabo un estudio clínico en seres humanos doble ciego, controlado por placebo en pacientes con diabetes de Tipo 2 y los datos obtenidos inicialmente de cinco pacientes que recibieron el anticuerpo IL-1 β designado AB7 (descrito anteriormente) a una dosis de 0,01 mg/kg a través de una infusión intravenosa con velocidad constante se usaron para examinar la farmacocinética.

35 En el Día 1 del estudio, el anticuerpo se administró a través de una infusión intravenosa con velocidad constante de 30 minutos. Se realizaron evaluaciones de seguridad, incluyendo el registro de eventos adversos, exámenes físicos, signos vitales, ensayos clínicos de laboratorio (por ejemplo, química sanguínea, hematología, urianálisis), niveles plasmáticos de citoquinas, y electrocardiogramas (ECG) usando prácticas médicas estándar conocidas en la técnica. Se recogieron muestras de sangre antes de la administración de la dosis y en 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 IL-1 β (farmacocinética). Los análisis preliminares de la farmacocinética del anticuerpo IL-1 β en sujetos que recibieron una única dosis IV de 0,01 mg/kg mostraron perfiles de concentración sérica-tiempo con una vida media terminal de 22 días, aclaramiento de 2,9 mL/día/kg y volumen de distribución del compartimento central de 50 mL/kg, muy similar al volumen sérico (Figura 7).

40 El análisis provisional de los datos de farmacocinética después de la administración IV de una única dosis de AB7 (XOMA 052) en sujetos en los grupos de dosis 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, ó 1,0 mg/kg confirmó adicionalmente que los perfiles de concentración sérica-tiempo con una vida media terminal de 22 días, aclaramiento de 2,54 mL/día/kg y volumen de distribución del compartimento central de 41,3 mL/kg, muy similar al volumen sérico (Figura 8).

Ejemplo 7

Efectos de un anticuerpo IL-1 β en CRP en sujetos humanos con diabetes Tipo 2

50 La proteína C reactiva (CRP), que se libera por el hígado en respuesta a varios desencadenantes de estrés, incluyendo IL-6, producida en respuesta a IL-1, también se midió en suero a los mismos puntos de tiempo que las muestras PK para determinar la actividad del anticuerpo en sujetos humanos. Una única dosis de XOMA 052 redujo los niveles de proteína C reactiva ultra-sensible (usCRP), una medida estándar de la inflamación sistémica asociada con múltiples enfermedades y un indicador de riesgo cardiaco, en todos los grupos de dosis tratados comparados con placebo. Como se muestra en la Figura 9, a los 28 días después de una única dosis de XOMA 052, las reducciones medias en porcentaje en usCRP fueron 33, 46, 47, 36, y 26 para los grupos de dosis 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, y 1,0 mg/kg, respectivamente, comparado con 4 por ciento para placebo. La actividad resultante de una única administración de anticuerpo a una dosis de 0,01 mg/kg indica que pueden usarse incluso dosis más bajas.

Ejemplo 8**Uso de un anticuerpo IL-1 β en el tratamiento de gota en un modelo animal**

La eficacia de un anticuerpo IL-1 β , tal como un anticuerpo que tiene las propiedades mencionadas anteriormente o como se describe en la presente memoria, se evaluó en un modelo de ratón de gota aguda. El modelo de ratón de gota aguda evalúa la capacidad de un agente terapéutico de bloquear la peritonitis inducida por cristales de urato monosódico (MSU) (Martinon et al., 2006, Nature 440: 237-241). Específicamente, se indujo peritonitis inyectando 0,5 mg de cristales de MSU en el espacio peritoneal de ratones Balb/c. Los ratones se trataron 2 horas antes por inyección intraperitoneal de anticuerpo de control de isotipo o anticuerpo anti-IL-1 β XOMA 052 (también referido como AB7 en la presente memoria, descrito anteriormente) a 10 mg/kg. Para comparación, un grupo de ratones recibió Anakinra a 30 mg/kg al mismo tiempo que la inyección de MSU. Después de 6 horas, se llevó a cabo un lavado peritoneal y el fluido de lavado se centrifugó para recoger las células. Las células se contaron y una fracción se usó para citocentrifugado y recuentos diferenciales de leucocitos. La peritonitis se midió calculando el número de neutrófilos en el lavado. El número de neutrófilos se determina multiplicando el recuento celular total en el lavado por el porcentaje de neutrófilos en el recuento diferencial. Como se muestra en las Figuras 8A y 8B, el anticuerpo XOMA 052 fue capaz de bloquear la infiltración de neutrófilos y macrófagos, y reducir la peritonitis inducida por los cristales de MSU respecto a los controles de PBS e isotipo ($p < 0,05$, ensayo t no emparejado). No existieron diferencias significativas entre el tratamiento con 10 mg/kg de XOMA 052 y 30 mg/kg de Anakinra en el modelo de ratón.

Ejemplo 9**Uso de un anticuerpo IL-1 β en el tratamiento de gota**

Los anticuerpos IL-1 β o fragmentos, tales como los que tienen las propiedades mencionadas anteriormente o descritos en la presente memoria, pueden administrarse a un sujeto (por ejemplo, paciente humano) para el tratamiento terapéutico y/o prevención de gota. Específicamente, en un ejemplo, se usa un anticuerpo IL-1 β XOMA 052 (también conocido como AB7, descrito anteriormente) para el tratamiento terapéutico de pacientes que presentan signos y síntomas de gota. La seguridad y eficacia del anticuerpo IL-1 β para gota se demuestran en uno o más estudios clínicos en seres humanos, incluyendo por ejemplo un ensayo con el diseño siguiente en sujetos con gota aguda recurrente.

Los sujetos pueden incluirse en el estudio si cumplen todos los criterios siguientes:

- Gota aguda diagnosticada cumpliendo los criterios de los Criterios 1977 para la Clasificación de Artritis Aguda de Gota Primaria (American Rheumatism Association, ACR). Un diagnóstico de gota aguda se confirma por a) la presencia de cristales de urato característicos en el fluido articular; b) un tofo que se ha probado o se sospecha que contiene cristales de urato por microscopía con luz polarizada; o c) la presencia de al menos 7 de los 12 fenómenos clínicos, de laboratorio, o radiográficos siguientes:
 - Más de un ataque en la vida de artritis aguda
 - Inflamación máxima desarrollada en 1 día
 - Ataque de artritis monoarticular
 - Enrojecimiento articular observado
 - Dolor o hinchazón de la primera articulación metatarsofalángica (MTP)
 - Ataque unilateral de la primera articulación MTP
 - Ataque unilateral de la articulación tarsal
 - Tofo (probado o sospechoso)
 - Hiperuricemia
 - Hinchazón asimétrico en una articulación en rayos X/examen
 - Quistes subcorticales sin erosiones en rayos X
 - Cultivo de fluido articular negativo para organismos durante el ataque
 - Al menos dos ataques de gota aguda en al año previo

- El inicio del episodio agudo actual debe haber ocurrido no más de 48 horas antes de la administración del fármaco de estudio en el Día 0 y los síntomas del ataque agudo no deben haber disminuido significativamente antes de la dosificación del fármaco de estudio

5 Se llevó a cabo un estudio de única dosis, de fase 1/2, doble ciego, controlado por placebo, de grupos paralelos de la seguridad y farmacocinética del anticuerpo XOMA 052 en sujetos que experimentan ataques de gota aguda. Los sujetos en grupos de dosis paralelos de seis sujetos cada uno (múltiples grupos de fármaco activo y un grupo de placebo) se incluyen para recibir una única infusión IV del fármaco de estudio (anticuerpo IL-1 β o placebo) a los niveles de dosis mostrados en la tabla siguiente.

Grupo de Dosis	Número de Sujetos	Régimen de Dosis
A	6	Única infusión IV de anticuerpo a 0,03 mg/kg
B	6	Única infusión IV de anticuerpo a 0,1 mg/kg
C	6	Única infusión IV de anticuerpo a 0,3 mg/kg
D	6	Única infusión IV de anticuerpo a 1,0 mg/kg
E	6	Única infusión IV de anticuerpo a 3,0 mg/kg
F	6	Única infusión IV de placebo

10 Los sujetos que cumplen todos los criterios de elegibilidad se incluyen, aleatorizan en uno de los grupos de dosis, y se dosifican en el Día 0 con el fármaco de estudio (anticuerpo o placebo). Los sujetos deben dosificarse en las 48 horas del inicio del nuevo ataque de gota aguda. Un nuevo ataque se define como uno que sigue al menos 28 días en los que el sujeto no tiene síntomas de gota aguda.

15 Las evaluaciones semanales se llevan a cabo desde el Día 28, seguido de evaluaciones bisemanales desde el Día 56. La seguridad se evalúa por medidas seriadas antes y después del tratamiento de signos vitales, evaluaciones clínicas de laboratorio, y el registro de eventos clínicos adversos. Los datos PK se recogen y analizan a los mismos puntos de tiempo mostrados más adelante.

Evaluación Farmacocinética

20 Se recogen muestras de suero en el Día 0 (línea base) antes de la administración del fármaco de estudio, y a puntos de tiempo seleccionados después de la administración del fármaco de estudio para la medida de las concentraciones séricas de anticuerpo IL-1 β .

25 A partir de estas concentraciones séricas, se calculan los parámetros farmacocinéticos apropiados. Se espera que estos cálculos empleen métodos farmacocinéticos compartimentales y no compartimentales para estimar los parámetros siguientes: concentración en el pico, aclaramiento sérico, vidas medias, volúmenes de distribución, y tiempo de residencia medio. Pueden emplearse métodos de análisis de PK y PD de la población para entender mejor las características PK/PD del anticuerpo IL-1 β en esta población.

La farmacocinética del anticuerpo IL-1 β se evalúa para su correlación con marcadores biológicos y resultado clínico. Además, se hace una evaluación de la correlación entre la exposición al fármaco y cualquier evidencia de toxicidad del fármaco.

Actividad Biológica y Clínica

35 Como medidas de la actividad biológica del anticuerpo IL-1 β en sujetos con gota aguda recurrente, se recogen CRP y ESR como marcadores inflamatorios. El estado clínico de la gota, incluyendo nivel de dolor y curso de tiempo, se mide mediante evaluaciones médicas periódicas y auto-evaluaciones del sujeto. La evaluación clínica del episodio de gota aguda incluye una evaluación del médico del enrojecimiento, sensibilidad, e hinchazón (ninguna de las cuales es atribuible a otras causas), una evaluación global del médico, y una auto-evaluación del dolor por el sujeto, una evaluación global del paciente, y un HAQ. Se proporcionó a los sujetos un diario y se les requirió reportar sus síntomas cada 2 horas durante la vigilia time en las primeras 24 horas después de la dosis, seguido de dos veces al día desde el Día 7, una vez al día desde el Día 14, y sólo si los síntomas recurren de ahí en adelante.

La evaluación clínica de la gota aguda incluye los componentes siguientes:

40 Evaluaciones del Médico:

- Evaluación Global del Médico (escala análoga de 10 puntos)

- Evaluación del médico de eritema (escala análoga de 10 puntos)
- Evaluación del médico de calor (escala análoga de 10 puntos)
- Evaluación del médico de hinchazón (escala análoga de 10 puntos)

Evaluaciones del Sujeto:

- 5
- Evaluación Global del Paciente (escala análoga de 10 puntos)
 - Dolor en reposo (escala análoga de 10 puntos)
 - Dolor con carga de peso/movimiento (escala análoga de 10 puntos)
 - Cuestionario de Evaluación de Salud (HAQ)

Además, se llevan a cabo las evaluaciones siguientes en varios puntos de tiempo de recogida de las muestras:

- 10
- El suero recogido a varios puntos de tiempo se usa para evaluar los niveles de adipoquinas y citoquinas que pueden producirse por el tejido adiposo inflamado en pacientes con gota. Dichas adipoquinas/citoquinas incluyen, por ejemplo, adiponectina, resistina, leptina, visfatina, PAI 1, TNF α , IL-1, IL-1Ra, IL-6, IL-8, RANTES, y MCP-1.
 - Una muestra de sangre completa se recoge y se ensaya para citoquinas que pueden incluir, por ejemplo, TNF α , IL-6, IFN γ , IL-8, e IL-1 α .

15 **Esquema de Muestreo de PK**

Punto de Tiempo	Todos los Grupos
Día 0	
Antes de la infusión	X
EOI	X
EOI + 30 \pm 5 min	X
EOI + 4 hr \pm 15 min	X
Día 1 (24 \pm 2 hr post EOI)	X
Día 2 (48 \pm 2 hr post EOI)	X
Día 3 (72 \pm 3 hr post EOI)	X
Día 4 (96 \pm 3 hr post EOI)	X
Día 7	X
Día 9	X
Día 11	X
Día 14	X
Día 21	X
Día 28	X
Día 42	X
Día 56	X

¹ Las adipoquinas/citoquinas se analizan usando muestras recogidas en algunos o todos los puntos de tiempo PK. Las adipoquinas/citoquinas medidas pueden incluir, por ejemplo, adiponectina, resistina, leptina, visfatina, PAI 1, TNF α , IL-1, IL-1Ra, IL-6, IL-8, RANTES, y MCP-1. EOI= final de la infusión.

5 Tomando como base los resultados del primer estudio clínico, se llevan a cabo estudios clínicos adicionales. Dichos estudios incluyen una o más de las dosificaciones y regímenes de dosificación anteriores, así como o alternativamente una o más dosificaciones diferentes de anticuerpo IL-1 β , tratamiento y/o periodos de observación más largos y números mayores de pacientes por grupo (por ejemplo, al menos aproximadamente 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1.000).

10 El uso de los términos "un" y "una" y "el" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones siguientes) debe considerarse que abarca tanto el singular como el plural, a no ser que se indique otra cosa en la presente memoria o se contradiga claramente por el contexto. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" deben considerarse como términos con extremos abiertos (es decir, que significan "que incluye, pero no está limitado a") a no ser que indique otra cosa. Siempre que se use un término con extremos abiertos para describir una característica o elemento de la invención, se contempla específicamente que puede usarse un término con extremos cerrados en lugar del término con extremos abiertos sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Se pretende que el recitado de intervalos de valores en la presente memoria sirva meramente como método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentra en el intervalo, a no ser que se indique otra cosa en la presente memoria, y cada valor separado se incorpora en la especificación como si se hubiera recitado individualmente en la presente memoria. Todos los métodos descritos en la presente memoria pueden llevarse a cabo en cualquier orden adecuado a no ser que se indique otra cosa en la presente memoria o se contradiga claramente por el contexto. Se pretende que el uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") proporcionado en la presente memoria, ilumine mejor la invención.

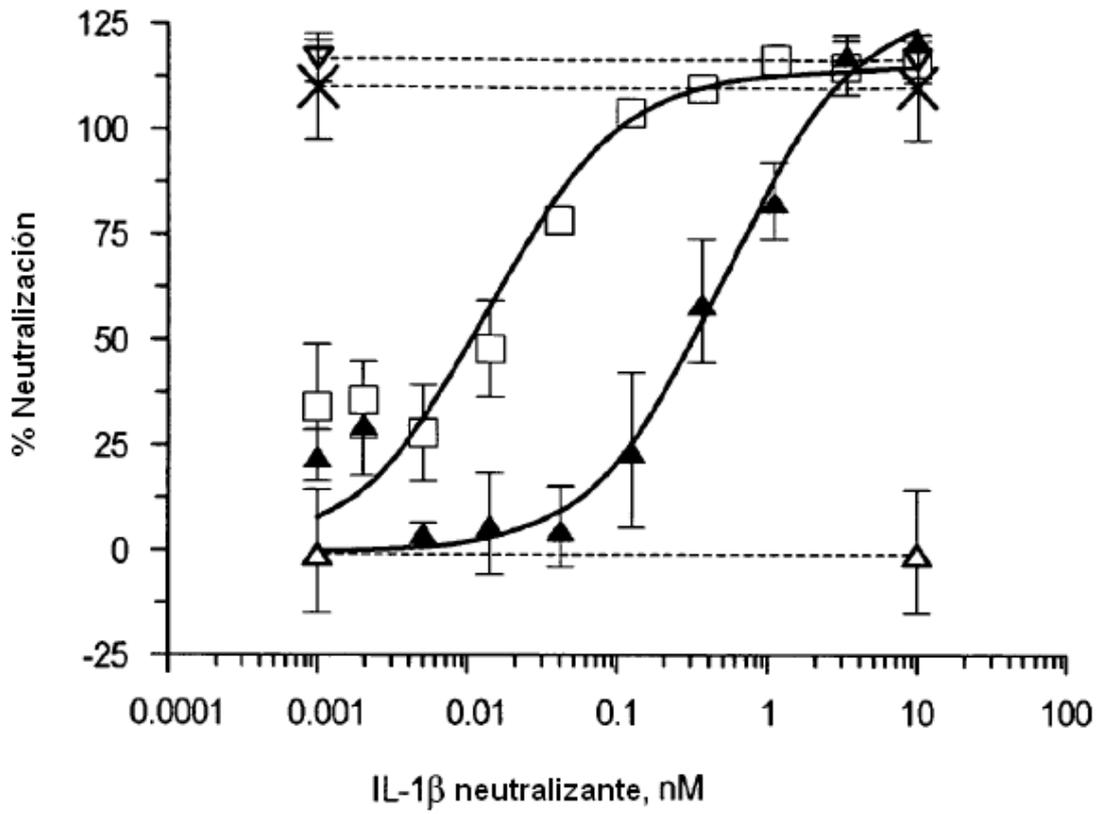
20 Las realizaciones preferidas de esta invención se describen en el contexto de la descripción de la invención, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Las variaciones de estas realizaciones preferidas pueden ser evidentes para los expertos en la técnica después de leer la descripción anterior. Los inventores esperan que los expertos en la técnica empleen dichas variaciones según sea apropiado.

25

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de unión a IL-1 β de éste para uso en el tratamiento de la gota, en el que el anticuerpo o fragmento de éste tiene una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6.
- 5 2. Un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de unión a IL-1 β de éste para uso de la reivindicación 1, en el que la gota es gota crónica o aguda.
3. Un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de unión a IL-1 β de éste para uso de la reivindicación 1-2, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se administra en una o más dosis de 1 mg/kg o menos de anticuerpo o fragmento de anticuerpo.
- 10 4. Un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de unión a IL-1 β de éste para uso de la reivindicación 3, en el que la una o más dosis son al menos 0,001 mg/kg de anticuerpo o fragmento.
5. Un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de unión a IL-1 β de éste para uso de las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento se administra por inyección subcutánea, intravenosa o intramuscular.
- 15 6. Un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de unión a IL-1 β de éste para uso de las reivindicaciones 1-5, en el que la administración de una dosis inicial del anticuerpo o fragmento de anticuerpo está seguida de la administración de una o más dosis posteriores.
7. Un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de unión a IL-1 β de éste para uso de las reivindicaciones 1-5, en el que la administración de una dosis inicial del anticuerpo o fragmento de anticuerpo está seguida de la administración de una o más dosis posteriores, y en el que dicha una o más dosis posteriores están en una cantidad que es aproximadamente la misma o menor que la dosis inicial.
- 20 8. Un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de unión a IL-1 β de éste para uso de las reivindicaciones 1-5, en el que la administración de una dosis inicial del anticuerpo o fragmento de anticuerpo está seguida de la administración de una o más dosis posteriores, y en el que al menos una de las dosis posteriores está en una cantidad que es mayor que la dosis inicial.
- 25 9. Un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de unión a IL-1 β de éste para uso de las reivindicaciones 1-8, en el que la dosis del anticuerpo o fragmento es suficiente para conseguir al menos una reducción del 50% en el dolor articular.
10. Un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de unión a IL-1 β de éste para uso de las reivindicaciones 1-9, en el que la dosis del anticuerpo o fragmento es suficiente para conseguir al menos una disminución del 20% en los niveles de CRP.
- 30 11. Un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de unión a IL-1 β de éste para uso de las reivindicaciones 1-10, en el que la dosis del anticuerpo o fragmento es suficiente para conseguir al menos una disminución del 20% en ESR.
12. Un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de unión a IL-1 β de éste para uso de las reivindicaciones 1-9, en el que la dosis del anticuerpo o fragmento es suficiente para conseguir al menos una reducción del 50% en el dolor articular, al menos una disminución del 20% en CRP y al menos una disminución del 20% en ESR.
- 35 13. Un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de unión a IL-1 β de éste para uso de las reivindicaciones 1-12, en el que dicho método está en conjunción 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 IL-1 β o fragmento.
- 40 14. Un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de unión a IL-1 β de éste para uso de la reivindicación 13, en el que dicha al menos una composición farmacéutica que comprende un agente activo distinto de un anticuerpo IL-1 β o fragmento se selecciona del grupo que consiste en un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo (NSAID), un corticosteroide, una hormona adrenocorticotrópica, y una colchicina.
- 45 15. Un anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de unión a IL-1 β de éste para uso de las reivindicaciones 1-14, en el que el anticuerpo o fragmento de éste 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 humana completa que mide la producción de IL-8 inducida por IL-1 β .

FIG. 1



- Ab7
- ▲ Kineret
- X--- Ab7 solo, 10nM
- ▽--- Kineret solo, 10nM
- △--- KLH8-G2 10nM

FIG. 2

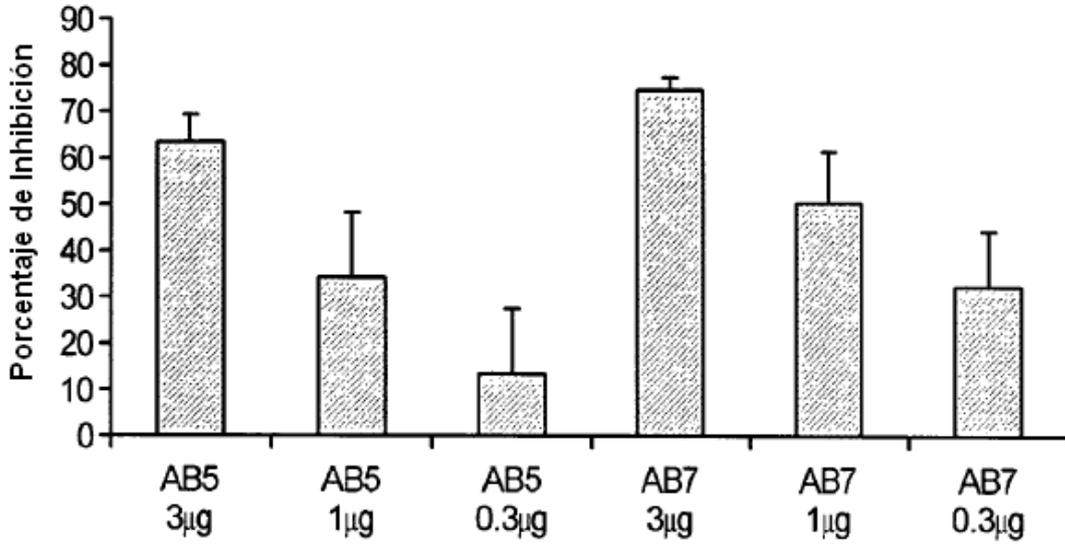


FIG. 2B

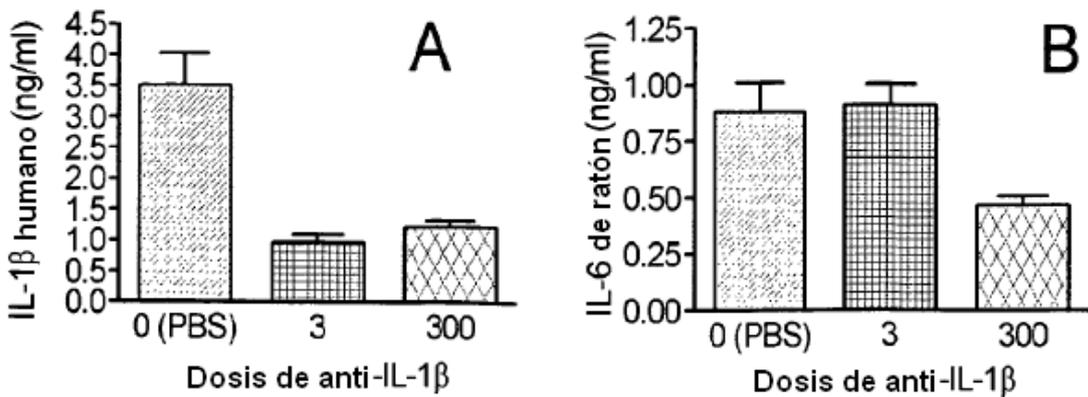


FIG. 3

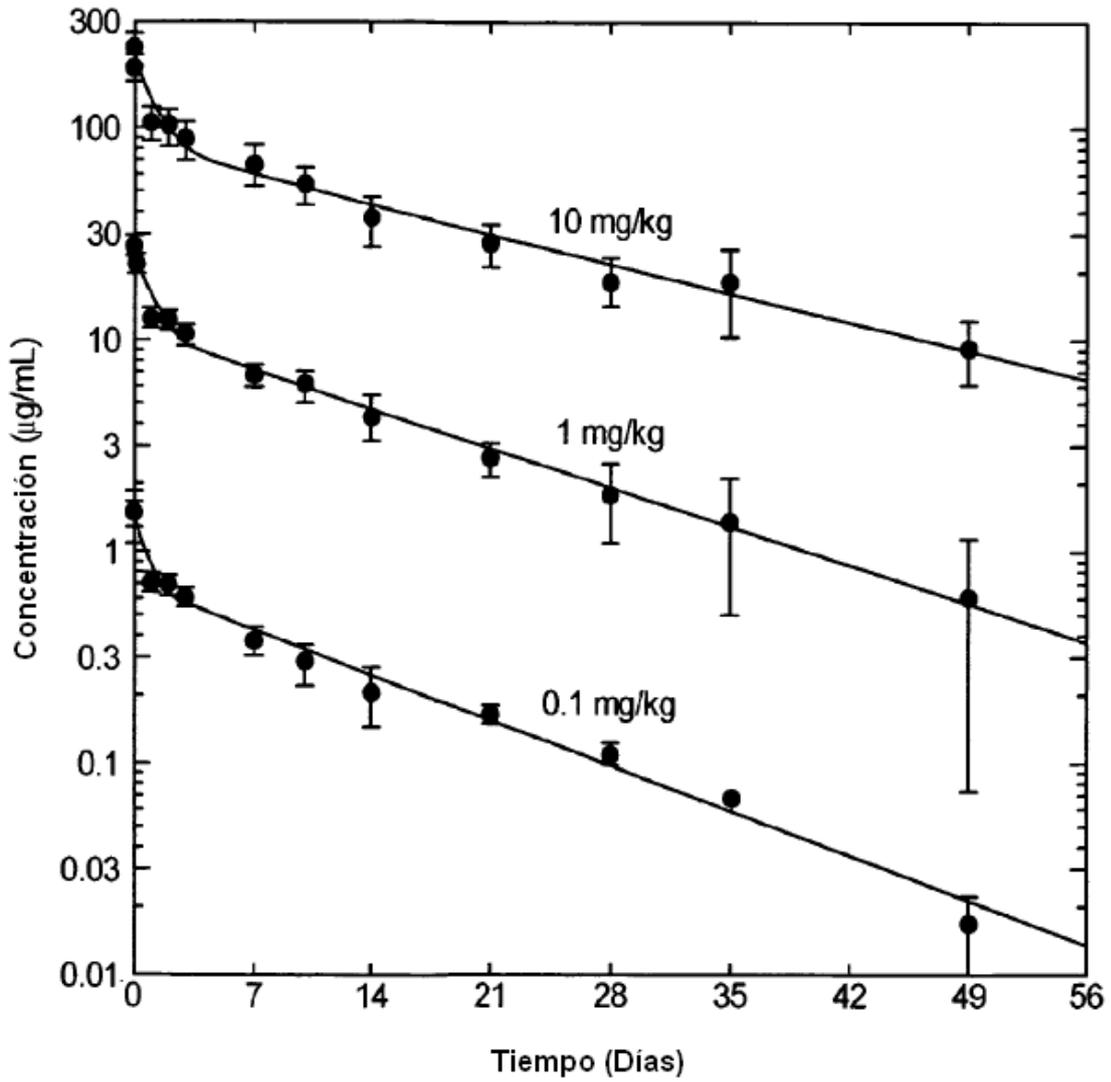


FIG. 4

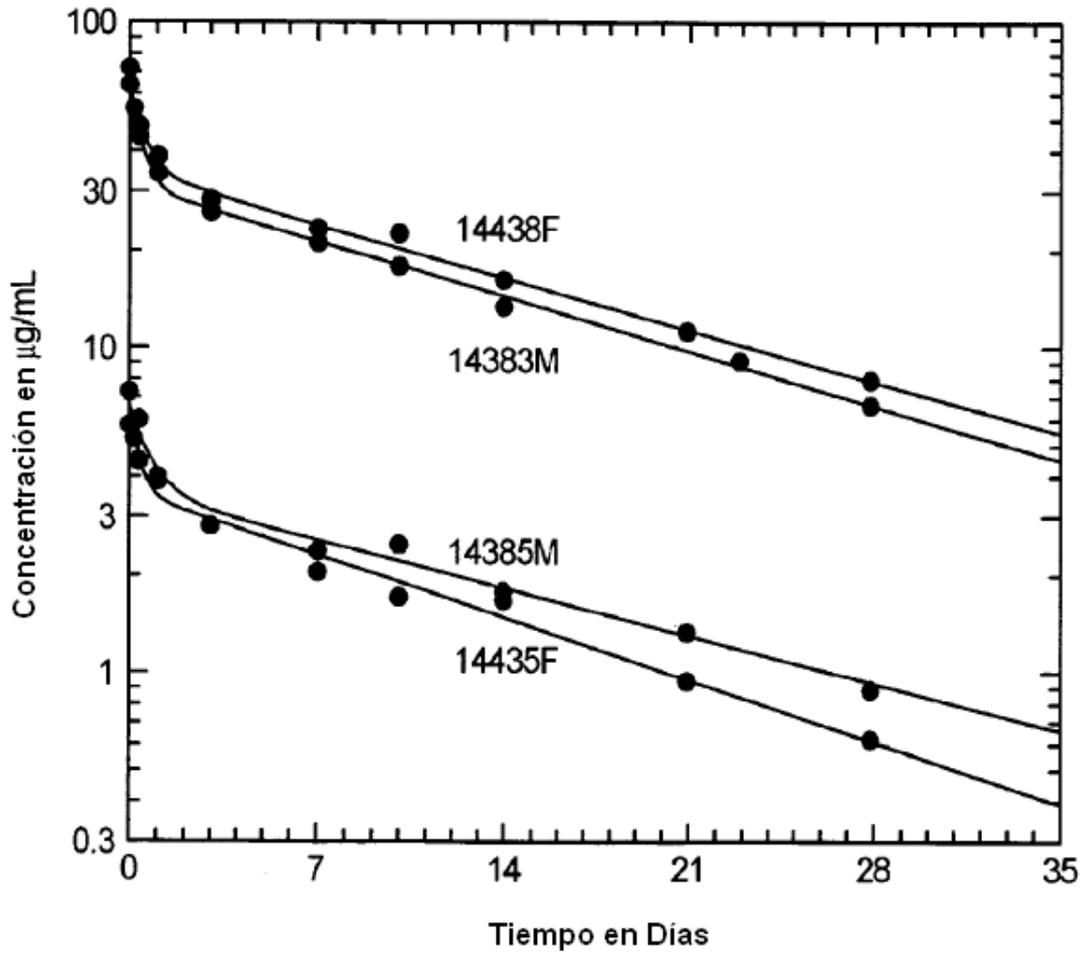


FIG. 5

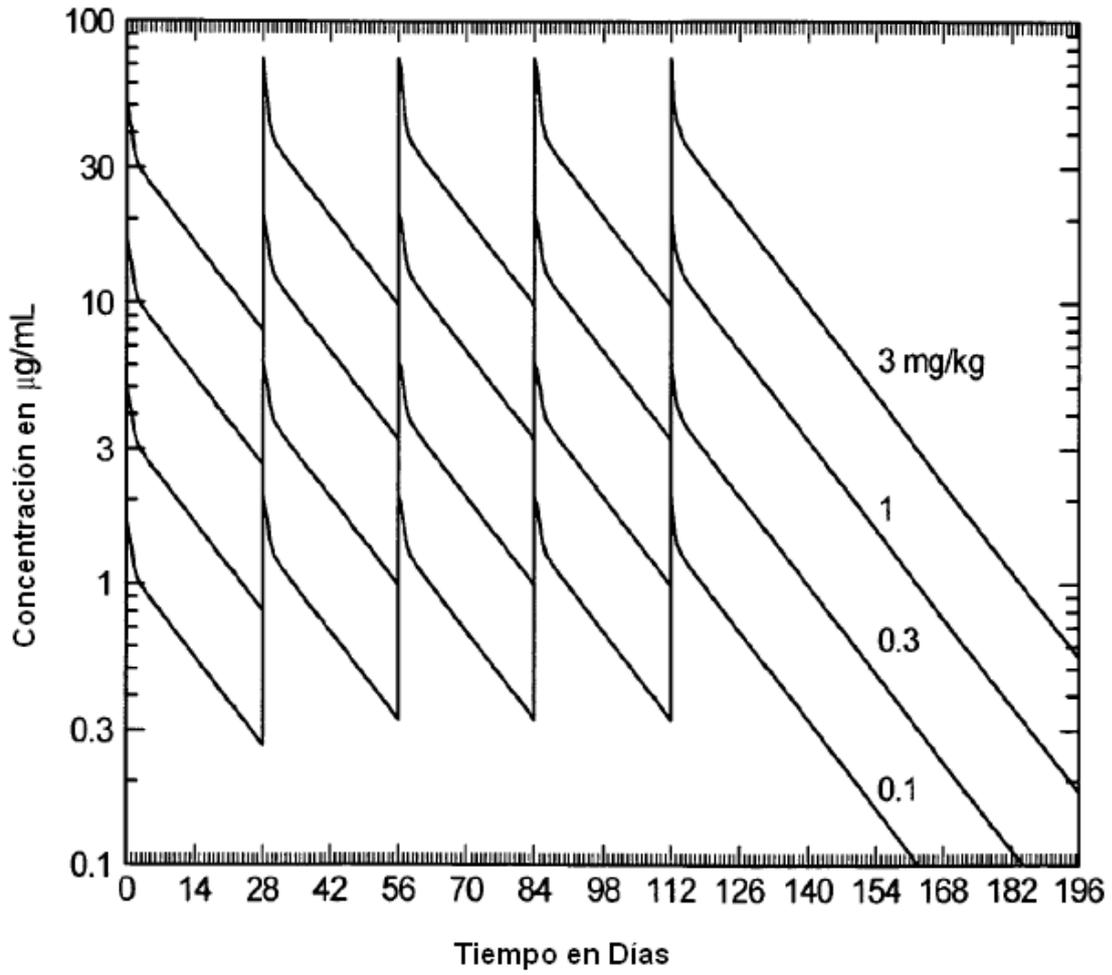


FIG. 7

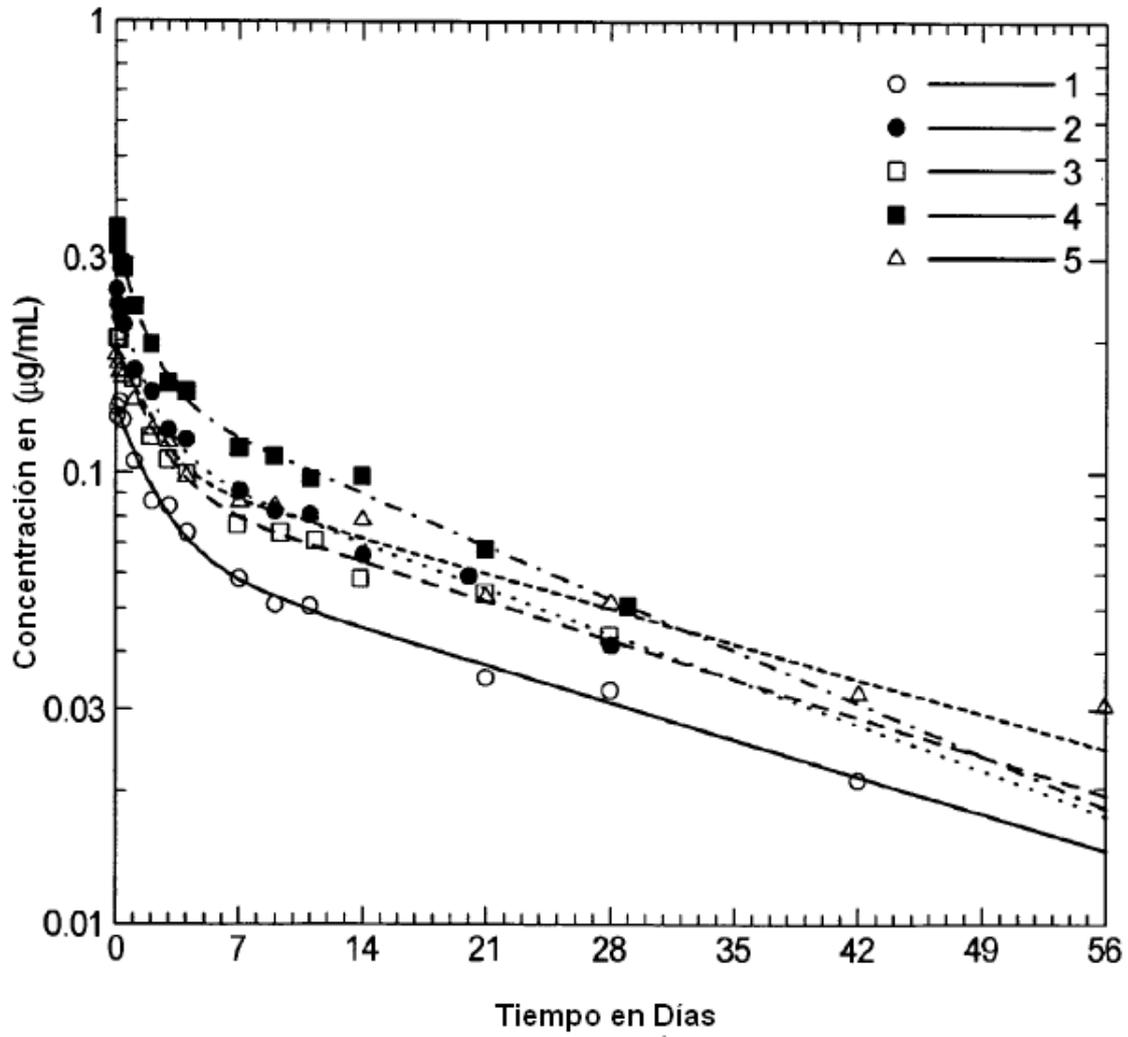
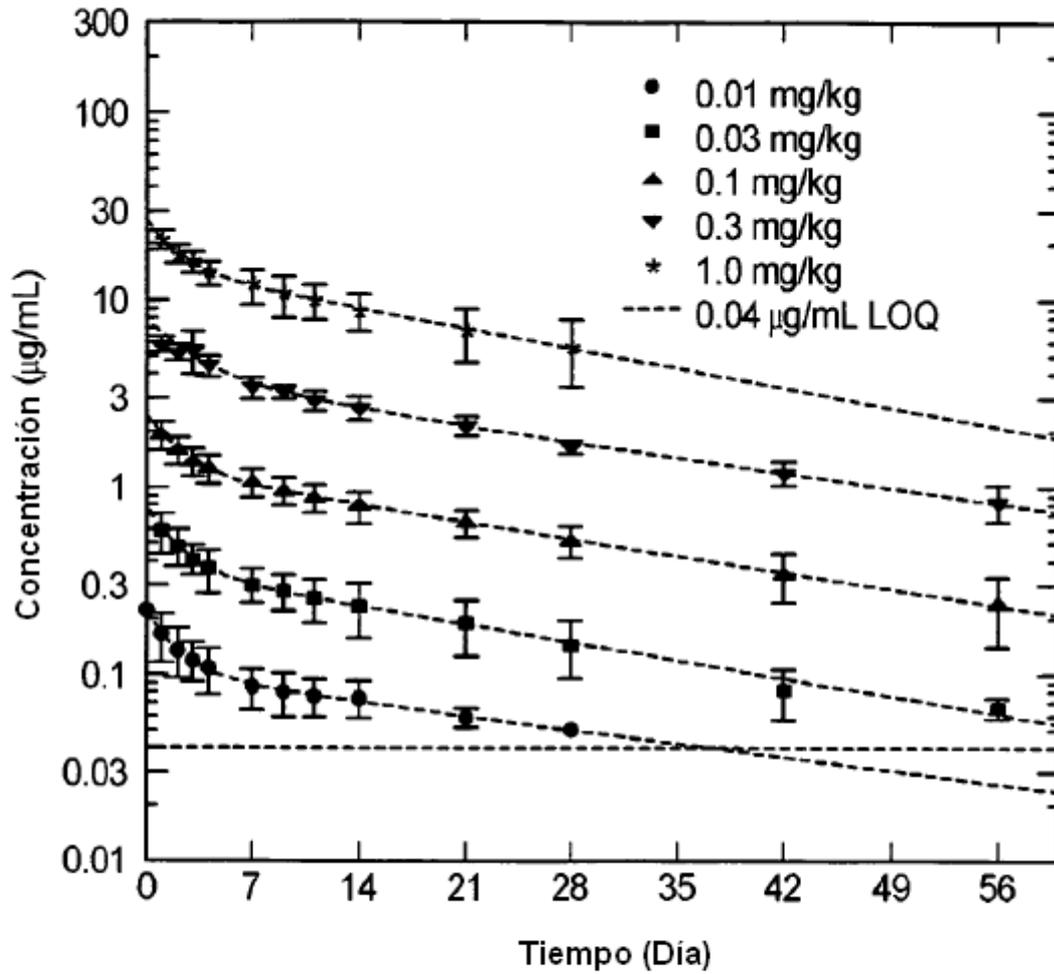


FIG. 8



$T_a = 1.42$
 $T_B = 22.0$ días
 $CL = 2.54$ mL/día/kg
 $V_c = 41.3$ mL/kg
 $F_{alfa} = 0.061$

LOQ = Límite de Cuantificación

FIG. 9

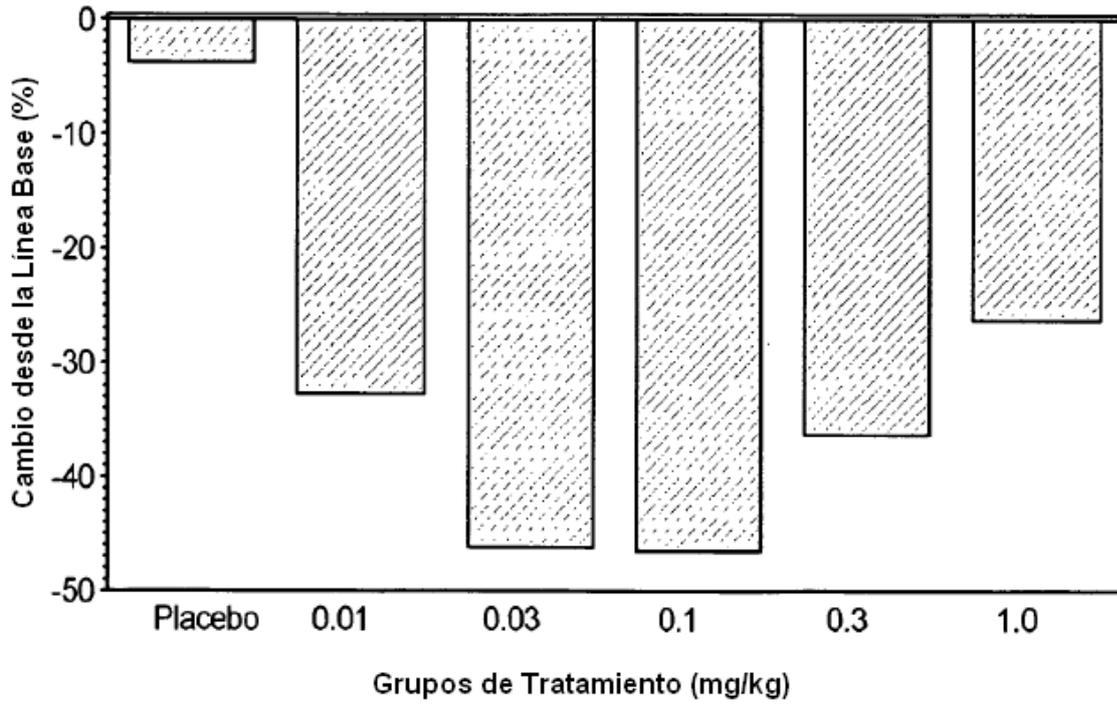


FIG. 10A

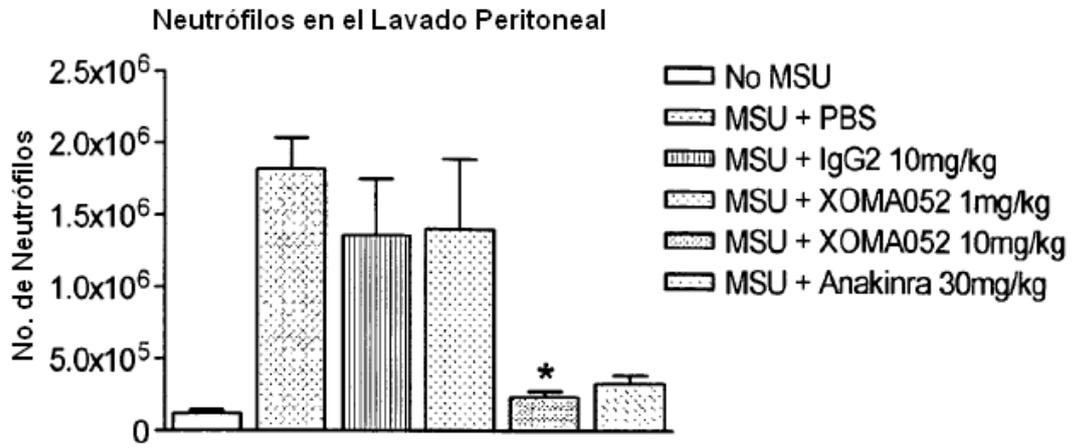


FIG. 10B

