

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 917**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 5/12 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2006 E 10179089 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2322552**

54 Título: **Anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen a IL-1 β**

30 Prioridad:

21.06.2005 US 692830 P

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

13.05.2016

73 Titular/es:

XOMA (US) LLC (100.0%)
2910 Seventh Street
Berkeley, CA 94710, US

72 Inventor/es:

MASAT, LINDA;
HAAK-FRENDSCHO, MARY;
CHEN, GANG;
HORWITZ, ARNOLD y
ROELL, MARINA

74 Agente/Representante:

MIR PLAJA, Mireia

ES 2 569 917 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

Anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen a IL-1 β .

5 Referencia cruzada a solicitud relacionada

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional US N° Serie 60/692.830, presentada el 21 de junio de 2005.

10 Campo de la invención

La invención se refiere a anticuerpos de unión a la IL-1 β , y que incluyen fragmentos de los mismos, y a ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos, así como a vectores, células y composiciones que comprenden los anticuerpos o ácidos nucleicos, y a usos de los mismos.

15 Antecedentes de la invención

La familia interleuquinas-1 (IL-1) de las citoquinas ha venido estando implicada en estados de enfermedad tales como artritis reumatoide (RA), osteoartritis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa (UC), shock séptico, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), asma, enfermedad de injerto contra huésped, aterosclerosis, leucemia de células T del adulto, mieloma múltiple, esclerosis múltiple, ictus y enfermedad de Alzheimer. Los miembros de la familia de las IL-1 incluyen la IL-1 α , la IL-1 β y la IL-1Ra. A pesar de que están emparentadas por su capacidad para unirse a receptores de IL-1 (IL-1R1 e IL-1R2), cada una de estas citoquinas viene expresada por un gen distinto y tiene una secuencia distinta de aminoácidos primarios. Además las actividades fisiológicas de estas citoquinas pueden diferenciarse.

Se han investigado compuestos que alteran la señalización de los receptores de IL-1, como agentes terapéuticos para tratar enfermedades mediadas por IL-1. Estos compuestos incluyen la IL-1Ra recombinante (Amgen Inc., Thousand Oaks, CA) y el péptido "trampa" de receptores de IL-1 (Regeneron Inc., Tarrytown, NY). También han sido investigados anticuerpos monoclonales derivados de animales que se unen a citoquinas IL-1. Sin embargo, su valor clínico puede ser limitado debido a su inmunogenicidad. Por ejemplo, se ha tenido conocimiento que sujetos humanos a los que se les han administrado anticuerpos monoclonales de ratón producen anticuerpos anti-ratón humanos (HAMA). Se ha descrito que los HAMA reducen la eficacia de la terapia con anticuerpos monoclonales y producen reacciones adversas entre las que se incluyen daños renales. Otros anticuerpos para IL-1 β pueden quedar limitados por su afinidad de unión y/o su potencia. En consecuencia, se necesitan compuestos adicionales que alteren la señalización de los receptores de IL-1. La invención aporta dichos compuestos, así como métodos para preparar y usar dichos compuestos.

Breve resumen

La invención proporciona un anticuerpo que se une a la IL-1 β o un fragmento del mismo que se une a la IL-1 β , en donde el anticuerpo o fragmento se une a IL-1 β humana con una constante de disociación menor que 1pM y en donde el anticuerpo o fragmentos de unión se une a substancialmente el mismo epítopo que un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°:11 y una región de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°:15, a la que se une. En la presente se proporciona también un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, así como un vector que comprende el ácido nucleico, una célula que comprende el ácido nucleico o vector, y una composición que comprende el anticuerpo, ácido nucleico, o vector.

En el contexto se describe un método para tratar o prevenir una enfermedad en un mamífero, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, ácido nucleico, o vector de la invención a un mamífero que tenga necesidad de ello, con lo cual se trata o previene una enfermedad en el mamífero.

En el contexto de la presente invención se describe un método de preparación de un polipéptido madurado por afinidad que se une a la IL-1 β , que comprende (a) proporcionar un primer ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de unión a la IL-1 β y que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los ID SEC N°: 1 a 26 y un segundo ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que se diferencia de la primera secuencia de ácido nucleico en al menos un nucleótido, (b) llevar a cabo un reordenamiento de ácidos nucleicos para proporcionar dos o más ácidos nucleicos mutados, (c) seleccionar un ácido nucleico mutado que codifique un polipéptido que (i) se una a la IL-1 β con una afinidad mayor que la del polipéptido codificado por el primer ácido nucleico, (ii) tenga una selectividad para la IL-1 β con respecto a la IL-1 α que sea mayor que la del polipéptido codificado por el primer ácido nucleico, (iii) tenga una constante de disociación de la unión en equilibrio (K_D) para IL-1 β que sea menor que la del polipéptido codificado por el primer ácido nucleico, o (iv) inhiba la expresión de IL-6 sérica inducida por IL-1 β en un animal en mayor grado que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico, y (d) expresar el ácido nucleico mutado seleccionado, con lo cual se produce un polipéptido madurado por afinidad que se une a la IL-1 β .

La invención proporciona anticuerpos novedosos de unión a IL-1 β o fragmentos de los mismos de unión a IL-1 β , los cuales se unen a IL-1 β humana con una constante de disociación menor que 3 pM, alternativamente de aproximadamente 2 pM o menos, preferiblemente de aproximadamente 1 pM o menos. Dichos anticuerpos de alta afinidad se contemplan como útiles para varios métodos para tratar o prevenir enfermedades o condiciones relacionadas con la IL-1. Adicionalmente, los anticuerpos de unión a la IL-1 β o los fragmentos de unión a la IL-1 β se unen a un epítipo de IL-1 β de forma tal que el anticuerpo o fragmento unido no evita sustancialmente que la IL-1 β se una al receptor tipo I de IL-1. Adicionalmente, los anticuerpos de unión a la IL-1 β o los fragmentos de unión a la IL-1 β se pueden unir a sustancialmente el mismo epítipo que uno o más de los anticuerpos indicados como ejemplos que aquí se describen, tales como el anticuerpo denominado AB7, que comprende una región variable de cadena pesada. Adicionalmente, los anticuerpos de unión a la IL-1 β o los fragmentos de unión a la IL-1 β compiten con la unión de un anticuerpo que tenga la región variable de cadena ligera de ID SEC N°: 11 y la región variable de cadena pesada de ID SEC N°: 15. Adicionalmente, la presente invención abarca anticuerpos de unión a la IL-1 β o fragmentos de unión a la IL-1 β que se unen a un epítipo contenido en la secuencia ESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIE (ID SEC N°: 36). Los anticuerpos de unión a la IL-1 β ejemplificativos incluyen los anticuerpos designados AB5 y AB7 en la presente.

La invención también aporta anticuerpos de unión a la IL-1 ó fragmentos de los mismos de unión a la IL-1 β que tienen una constante de disociación menor que 3 pM, alternativamente de aproximadamente 1 pM o menos, y que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende una de las secuencias de aminoácidos de las ID SEC N°: 12, 13, 21, 23 o 24, o alternativamente la secuencia de aminoácidos de las ID SEC N°: 12, 13 o 21, o alternativamente la secuencia de aminoácidos ID SEC N°: 13 o 21, o alternativamente la secuencia de aminoácidos de las ID SEC N°: 8, 14 o 15, o alternativamente la secuencia de aminoácidos de las ID SEC N°: 8 o 15. El anticuerpo que se une a la IL-1 β o el fragmento que se une a la IL-1 β puede también comprender una región variable de cadena ligera que comprenda la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 9, ID SEC N°: 10 ó ID SEC N°: 11.

En el contexto de la presente invención se describen anticuerpos de unión a la IL-1 β , o fragmentos de los mismos de unión a la IL-1 β , los cuales se unen a la IL-1 β con una constante de disociación de entre aproximadamente 6pM y aproximadamente 50pM, como alternativa de entre aproximadamente 13pM y aproximadamente 25pM, y como alternativa de aproximadamente 19pM, y donde el anticuerpo o fragmento tiene una IC₅₀ menor que 0,5nM (500pM), como alternativa de entre aproximadamente 5pM y aproximadamente 200pM, como alternativa de entre aproximadamente 10pM y aproximadamente 100pM, y como alternativa de aproximadamente 30pM, para inhibir la liberación, estimulada por IL-1 β , de IL-6 desde fibroblastos humanos. IC₅₀ para inhibir la liberación, estimulada por IL-1 β , de IL-6 desde fibroblastos humanos se refiere a la concentración requerida para inhibir el 50% de IL-6 liberada por estimulación de los fibroblastos humanos con IL-1 β . Los ejemplos de anticuerpos incluyen el anticuerpo al que aquí se denomina AB 1.

En el contexto de la presente invención se describen anticuerpos de unión a IL-1 ó fragmentos de los mismos de unión a IL-1 β que tienen una constante de disociación de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 50pM y que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende una de las secuencias de aminoácidos de ID SEC N°: 4, 5 ó 6, como alternativa una de las secuencias de aminoácidos de ID SEC N°: 4 ó 5, y como alternativa las secuencias de aminoácidos de ID SEC N°: 4. Se contempla que en algunas circunstancias pueda ser deseable un anticuerpo que se una a la IL-1 β o un fragmento que se una a la IL-1 β que tenga una constante de disociación relativamente mayor, por ejemplo para algunos métodos de tratamiento o prevención de enfermedades o condiciones relacionadas con las IL-1 en las que sea deseable un grado de afinidad relativamente menor.

Los anticuerpos que se describen en el contexto de la invención incluyen los anticuerpos denominados AB1, AB2, AB3, AB4, AB5, AB6, AB7, AB8 y AB9, de manera que AB5, AB6, AB7, AB8 y AB9 forman parte de la materia objeto de la reivindicación 1. AB 1 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 9. AB2 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 5 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 9. AB3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 6 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 9. AB4 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 7 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 9. AB5 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 8 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 9. AB6 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 14 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 10. AB7 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 15 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 11. AB8 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 25 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 10. AB9 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 26 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 11.

La presente invención abarca anticuerpos de unión a la IL-1 β o fragmentos de unión a la IL-1 β que tienen una región variable de cadena pesada que comprende una cualquiera de las secuencias que se exponen en la ID SEC N°: 12-15, o 23-26, alternativamente una cualquiera de las secuencias que se exponen en la ID SEC N°: 8, alternativamente una cualquiera de las secuencias que se exponen en la ID SEC N°: 12 o ID SEC N°: 13, alternativamente una cualquiera de las secuencia que se exponen en la ID SEC N°: 14, la ID SEC N°: 15, la ID SEC N°: 25 o la ID SEC N°: 26.

La invención también abarca anticuerpos de unión a la IL-1 β o fragmentos de unión a la IL-1 β que tienen una región variable de cadena ligera que comprende una cualquiera de las secuencias que se exponen en la ID SEC N°: 9, u 11, alternativamente una cualquiera de las secuencias que se exponen en la ID SEC N°: 9, alternativamente una cualquiera de la secuencia que se expone en la ID SEC N°: 11.

La presente invención también abarca anticuerpos para IL-1 β o fragmentos de unión a la IL-1 β que comprenden la región variable de cadena pesada de la secuencia que se expone en ID SEC N°: 15, y la región variable de cadena ligera de la secuencia que se expone en la ID SEC N°: 11.

La presente invención también abarca anticuerpos de unión a la IL-1 β o fragmentos de unión a la IL-1 β que comprenden partes que no se unen a la IL-1 β pero, en cambio, son responsables de otras funciones, tales como la vida media circulante, el efecto citotóxico directo, el etiquetado detectable, o la activación de la cascada endógena del complemento o citotoxicidad celular endógena de un receptor. Los anticuerpos de la invención pueden comprender la totalidad o una parte de una región constante de un anticuerpo. La región constante se puede seleccionar de cualquier isotipo, incluyendo IgA (p. ej. IgA1 ó IgA2), IgD, IgE, IgG (p. ej. IgG1, IgG2, IgG3 ó IgG4), o IgM. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender una región IgG2. Además, o en lugar, de comprender una región constante, los anticuerpos y fragmentos de la invención pueden incluir un epítipo etiqueta, un epítipo de un receptor de rescate, una fracción etiquetadora con fines diagnósticos o de purificación, o una fracción citotóxica tal como un radionucleido o una toxina.

En el contexto de la presente invención se describen composiciones farmacéuticas que comprenden uno cualquiera de los anticuerpos de unión a la IL-1 β o fragmentos de unión a la IL-1 β y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente adecuado. Preferiblemente, los anticuerpos y compuestos de la invención se pueden administrar en una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, una cantidad suficiente para mejorar un signo o síntoma clínico de una condición o trastorno asociado a la expresión de la proteína diana, a un sujeto que tenga necesidad de dicho tratamiento. En una realización afín, la composición farmacéutica adicionalmente comprende un segundo agente activo. Todavía en otra realización afín, se aporta la composición farmacéutica en la que el segundo agente activo es un anticuerpo para o un antagonista del factor de crecimiento o una citoquina. En otra realización el segundo agente activo es otro anticuerpo.

En el contexto de la presente invención se describe el uso de los anticuerpos para IL-1 β o de fragmentos de unión a la IL-1 β en la fabricación de un medicamento para prevenir o reducir una condición o trastorno asociado a la IL-1. En cualquiera de los usos, el medicamento puede ser coordinado con un tratamiento que use un segundo agente activo. En otra realización de la invención se contempla el uso de una combinación sinérgica de un anticuerpo de la invención para la preparación de un medicamento con el fin de tratar un paciente que presente síntomas de una condición o trastorno relacionado con la IL-1 dado a conocer en la presente, en donde el medicamento se coordina con un tratamiento que usa un segundo agente activo. En una realización afín, el segundo agente activo es un anticuerpo para citoquina o antagonista de citoquina o un factor de crecimiento. Se contemplan realizaciones de cualquiera de los usos anteriormente mencionados en donde la cantidad del anticuerpo o fragmento que se une a la IL-1 β en el medicamento se encuentra en una dosis eficaz para reducir la dosificación de segundo agente activo requerido para lograr un efecto terapéutico.

También se describen kits en el contexto de la presente invención. En una realización, un kit comprende una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un compuesto o una composición de la invención (tal como un anticuerpo, un fragmento, un ácido nucleico, un vector o una célula), envasada en un recipiente, tal como un vial o una botella, y comprendiendo adicionalmente una etiqueta fijada al recipiente o envasada con el mismo, de manera que la etiqueta describe el contenido del recipiente y proporciona indicaciones y/o instrucciones relativas al uso del contenido del recipiente para prevenir o reducir una condición o enfermedad asociada a la expresión de la proteína diana.

55 **Breve descripción de las diversas vistas del(de los) dibujo(s)**

La Fig. 1 es un par de secuencias de aminoácidos que se corresponden con las cadenas ligeras y las cadenas pesadas de la región variable de algunos de los anticuerpos que aquí se describen. Las partes subrayadas de las secuencias de aminoácidos indican regiones determinantes de complementariedad (CDRs).

La Fig. 2 es un conjunto de secuencias de aminoácidos que se corresponden con las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de los anticuerpos AB1, AB2, AB3 y AB4. Las partes subrayadas de las secuencias de aminoácidos indican regiones determinantes de complementariedad (CDRs).

La Fig. 3 es un conjunto de secuencias de aminoácidos que se corresponden con las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de los anticuerpos AB5, AB5.1 y AB5.2. Las partes subrayadas de las secuencias de aminoácidos indican regiones determinantes de complementariedad (CDRs).

La Fig. 4 es un conjunto de secuencias de aminoácidos que se corresponden con las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de los anticuerpos AB5.3 y AB5.4. Las partes subrayadas de las secuencias de aminoácidos indican regiones determinantes de complementariedad (CDRs).

La Fig. 4A es un conjunto de secuencias de aminoácidos que se corresponden con las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de los anticuerpos AB6 y AB7. Las partes subrayadas de las secuencias de aminoácidos indican regiones determinantes de complementariedad (CDRs).

La Fig. 4B es un conjunto de secuencias de aminoácidos que se corresponden con las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de los anticuerpos AB8 y AB9. Las partes subrayadas de las secuencias de aminoácidos indican regiones determinantes de complementariedad (CDRs).

La Fig. 5 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento de estimulación con IL-1 β *in vitro*.

La Fig. 6 es un histograma que muestra los resultados de un experimento de estimulación con IL-1 β *in vivo*.

La Fig. 7 es un gráfico que muestra resultados de un ensayo de exclusión cinética para el anticuerpo denominado AB1.

La Fig. 8 es un gráfico que muestra resultados de un ensayo de exclusión cinética para el anticuerpo denominado AB5.

La Fig. 9 es un gráfico que muestra resultados de un ensayo de exclusión cinética para el anticuerpo denominado AB7.

La Fig. 10 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento de estimulación con IL-1 β *in vitro* para los anticuerpos denominados AB1, AB2 y AB3.

La Fig. 11 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento de estimulación con IL-1 β *in vitro* para los anticuerpos denominados AB1 y AB7.

La Fig. 12 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento de estimulación con IL-1 β *in vitro* para los anticuerpos denominados AB5 y AB7, así como para Kineret[®].

La Fig. 13 es un histograma que muestra los resultados de un experimento de estimulación con IL-1 β *in vivo* para los anticuerpos denominados AB5 y AB1.

La Fig. 14 es un histograma que muestra los resultados de un experimento de estimulación *in vivo* para los anticuerpos denominados AB5 y AB7.

La Fig. 15 es un Western blot que muestra los resultados de experimentos de reactividad cruzada para el anticuerpo denominado AB7 con IL-1 β de mono cynomolgus y macaco rhesus.

La Fig. 16 es un Western blot que muestra los resultados de experimentos de reactividad cruzada para el anticuerpo denominado AB7 con IL-1 β de perro, cobaya, y conejo.

La Fig. 17 es un Western blot que muestra los resultados de experimentos de reactividad cruzada para el anticuerpo denominado AB7 con IL-1 β recombinante humana, de ratón y de rata.

La Fig. 18 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento *in vitro* para el anticuerpo denominado AB7 y para Kineret que implica la producción de IL-8 inducida por IL-1.

La Fig. 19 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo para examinar si los presentes anticuerpos impiden que la IL-1 β se una al receptor tipo I de IL-1.

La Fig. 20 es una ilustración de un ensayo para examinar si los presentes anticuerpos impiden que la IL-1 β se una al receptor tipo I de IL-1.

Descripción detallada

La presente invención abarca anticuerpos y fragmentos novedosos para IL-1 β que tienen una afinidad y una potencia deseables. Como aspecto de la presente invención, se aportan anticuerpos de unión a la IL-1 β que presentan una

afinidad inesperadamente alta y unas constantes de disociación inesperadamente bajas (por ejemplo, menores que 3pM, como alternativa de aproximadamente 1pM o menores) en comparación con anticuerpos conocidos de unión a la IL-1 β . Los ejemplos de anticuerpos incluyen los anticuerpos que aquí se denominan AB5 y AB7.

5 La presente invención también abarca anticuerpos de unión a la IL-1 β o fragmentos de unión a la IL-1 β que se unen selectivamente a la IL-1 β de forma tal que se unen a la IL-1 β con una afinidad mayor que a otros antígenos. Los anticuerpos de unión a la IL-1 β o los fragmentos de unión a la IL-1 β pueden unirse selectivamente a la IL-1 β humana, pero también se unen de manera detectable a IL-1 β no humana. Como alternativa o adicionalmente, los anticuerpos o fragmentos pueden unirse a la IL-1 β humana y a la IL-1 β de al menos otro mamífero (un primer mamífero) y no a la IL-1 β de al menos otro mamífero (un segundo mamífero). Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos pueden unirse a uno o más de IL-1 β de roedor, IL-1 β de primate, IL-1 β de perro e IL-1 β de conejo, y/o no unirse a la IL-1 β de cobaya. Como alternativa o adicionalmente, los anticuerpos o fragmentos pueden unirse a la IL-1 β de ratón con una afinidad mayor que aquella con la que lo hacen a la IL-1 β de rata. Como alternativa o adicionalmente, los anticuerpos de unión a la IL-1 β o los fragmentos de unión a la IL-1 β pueden tener la misma o sustancialmente la misma potencia contra la IL-1 β humana y la IL-1 β de primate. Como alternativa o adicionalmente, los anticuerpos de unión a la IL-1 β o los fragmentos de unión a la IL-1 β pueden tener la misma o sustancialmente la misma potencia contra la IL-1 β humana recombinante y la IL-1 β humana endógena. Como alternativa o adicionalmente, los anticuerpos de unión a la IL-1 β o los fragmentos de unión a la IL-1 β pueden neutralizar la IL-1 β de ratón.

20 En el sentido que se le da en la presente, un anticuerpo o fragmento que se une específicamente con un antígeno diana se refiere a un anticuerpo que se une al antígeno diana con una afinidad mayor que aquella con la que lo hace con antígenos similares. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento es específico de su antígeno afín cuando las regiones variables del anticuerpo o fragmento reconocen y se unen el antígeno afín con una preferencia detectable (distinguiendo el antígeno de otros polipéptidos conocidos de la misma familia, en virtud de diferencias mensurables de la afinidad de unión, a pesar de la posible existencia de identidad, homología o similitud secuencial localizada entre miembros de la familia). Se comprenderá que anticuerpos y fragmentos específicos también pueden interaccionar con otras proteínas (por ejemplo la proteína A de *S. aureus* u otros anticuerpos en técnicas de ELISA) mediante interacciones con secuencias situadas fuera de la región variable de los anticuerpos, y en particular en la región constante del anticuerpo o fragmento. Son bien conocidos y se ponen rutinariamente en práctica en la técnica ensayos de cribaje para determinar la especificidad de unión de un anticuerpo. Para una amplia discusión de tales ensayos, véase Harlow et al. (redactores en jefe), *Antibodies A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), Capítulo 6.

Un aspecto de la presente invención abarca anticuerpos de unión a la IL-1 β y fragmentos de los mismos de unión a la IL-1 β que tienen constantes de disociación (K_D) inesperadamente bajas, por ejemplo menores que 3 pM, alternativamente 2 pM o menos, alternativamente 1 pM o menos, como alternativa 0,8pM o menos, como alternativa 0,74pM o menos, como alternativa 0,72pM o menos, como alternativa 0,7pM o menos, como alternativa 0,6pM o menos, como alternativa 0,56pM o menos, como alternativa 0,5pM o menos, como alternativa 0,3pM o menos, como alternativa 0,26pM o menos, como alternativa 0,24pM o menos, como alternativa 0,2pM o menos. Así, en algunas realizaciones de la presente invención, los anticuerpos y fragmentos de unión a la IL-1 β pueden describirse haciendo referencia a un extremo elevado de un intervalo de constantes de disociación. Adicionalmente o como alternativa, en algunas realizaciones de la presente invención, los anticuerpos y fragmentos de unión a la IL-1 β pueden describirse haciendo referencia a un extremo bajo de un intervalo de constantes de disociación, tal como por ejemplo un anticuerpo o fragmento que tenga una constante de disociación de 0,07pM o más, como alternativa de 0,1 pM o más, como alternativa de 0,11pM o más, como alternativa de 0,15pM o más, como alternativa de 0,2pM o más, como alternativa de 0,24pM o más, como alternativa de 0,26pM o más, como alternativa de 0,3pM o más, como alternativa de 0,5pM o más, como alternativa de 0,7pM o más. Pueden combinarse cualquier constante de disociación mayor y cualquier constante de disociación menor, según lo especificado anteriormente, para definir un intervalo de constantes de disociación, siempre que el valor menor seleccionado sea igual al valor más alto seleccionado o menor que el mismo. Los presentes anticuerpos y fragmentos se unen a la IL-1 β con alta afinidad, según indican las constantes de disociación que aquí se exponen. Las constantes de afinidad que caracterizan las afinidades de anticuerpos para antígenos pueden ser constantes de asociación medidas por medio de la cinética de formación de complejos antígeno-anticuerpo. Como alternativa, la afinidad de unión se puede caracterizar por una constante de disociación que es la inversa de la constante de asociación. En el sentido en el que se la usa en la presente, la expresión K_D está destinada a referirse a la constante de disociación de una interacción de anticuerpo-antígeno.

55 La presente invención también abarca anticuerpos neutralizantes o fragmentos neutralizantes de los mismos que se unen a la IL-1 β para neutralizar la actividad biológica de la IL-1 β . La neutralización de la actividad biológica de la IL-1 β se puede valorar mediante ensayos para uno o más indicadores de la actividad biológica de la IL-1 β , tales como la liberación estimulada por IL-1 β de IL-6 a partir de fibroblastos humanos u otras células, la liberación inducida por IL-1 β de IL-8 desde células de la sangre, o la proliferación inducida por IL-1 de células T auxiliares. Preferiblemente, los anticuerpos y fragmentos de la presente invención de unión a la IL-1 β neutralizan la actividad biológica de la IL-1 β que está en conexión con la función de señalización del receptor tipo I de IL-1 (IL-RI) al que se une la IL-1 β .

En general, los anticuerpos y fragmentos neutralizantes de la presente invención pueden neutralizar la actividad

biológica de la IL-1 β independientemente de si está bloqueada la unión de la IL-1 β al receptor tipo I de IL-1. Más preferiblemente, los anticuerpos de unión a la IL-1 β o los fragmentos de unión a la IL-1 β neutralizan la actividad biológica de la IL-1 β uniéndose a la IL-1 β sin impedir sustancialmente la unión de la IL-1 β unida, al receptor tipo I de IL-1. Una ventaja potencial de dichos anticuerpos y fragmentos es que los mismos pueden unirse a la IL-1 β y neutralizarla permitiendo aún al mismo tiempo que la IL-1 β se una al IL-1RI. Esto puede redundar en una reducción eficaz de la actividad biológica de la IL-1 α así como de la actividad biológica de la IL-1 β , puesto que hay menos sitios IL-1RI sin unión para que la IL-1 α se una a los mismos. Así, los anticuerpos y fragmentos de la presente invención de unión a la IL-1 β son útiles en métodos en los que es deseable neutralizar la actividad biológica de la IL-1 *in vitro* e *in vivo*.

Los presentes anticuerpos o fragmentos pueden ser anticuerpos o fragmentos neutralizantes que se unan específicamente a epítipo de IL-1 β que afecte a la actividad biológica de la IL-1 β . Los presentes anticuerpos o fragmentos pueden unirse a un epítipo de IL-1 β sensible a la neutralización. Cuando a un epítipo de IL-1 β sensible a la neutralización se le une uno de los presentes anticuerpos o fragmentos, el resultado es una pérdida de actividad biológica de la IL-1 β que contiene el epítipo.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de unión a la IL-1 β o los fragmentos de unión a la IL-1 β pueden tener una IC₅₀ para inhibir la liberación, estimulada por IL-1 β , de IL-1 β desde células de la sangre, que sea menor que 50pM, como alternativa aproximadamente 25pM o menos, como alternativa aproximadamente 10pM o menos, o como alternativa aproximadamente 2pM o menos. IC₅₀ para inhibir la liberación, estimulada por IL-1 β , de IL-1 β desde células de la sangre se refiere a la concentración requerida para inhibir el 50% de IL-8 liberada mediante la estimulación de las células de la sangre con IL-1 β . Los ejemplos de anticuerpos incluyen el anticuerpo al que aquí se denomina AB7.

La presente invención también describe un anticuerpo que se une a la IL-1 β o un fragmento del mismo que se une a la IL-1 β y que comprende una secuencia de aminoácidos modificada, en donde el aminoácido modificado presenta una o al menos una sustitución, adición o delección con respecto a una secuencia de aminoácidos de partida de la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 11 o la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 15, donde el anticuerpo o fragmento modificado tiene la misma o sustancialmente la misma afinidad y especificidad de unión al epítipo que la secuencia de aminoácidos de partida. Se contempla que puedan realizarse una o más sustituciones, delecciones o adiciones en los anticuerpos de unión a la IL-1 β o los fragmentos de unión a la IL-1 β que aquí se proporcionan, tales como anticuerpos o fragmentos que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 11 y una región de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 15, aunque manteniendo la misma o sustancialmente la misma afinidad y especificidad de unión al epítipo del anticuerpo o fragmento de partida. Por ejemplo, la presente invención abarca un anticuerpo que se une a la IL-1 β o un fragmento del mismo que se une a la IL-1 β , que comprende una secuencia de aminoácidos modificada, en donde el aminoácido modificado presenta una o al menos una sustitución, adición o delección con respecto a una secuencia de aminoácidos de partida que comprende la ID SEC N°: 15 o la ID SEC N°: 11 (o, como secuencia de partida, se puede usar cualquiera de las otras secuencias dadas a conocer en la presente, tal como las ID SEC N°: 8, 12, 13, 14, 23, 24, 25, 26, o 9, 10), donde el anticuerpo o fragmento modificado tiene la misma o sustancialmente la misma afinidad y especificidad de unión al epítipo que la secuencia de aminoácidos de partida que comprende la ID SEC N°: 15 o la ID SEC N°: 11 (o la secuencia particular que se usa como secuencia de aminoácidos de partida, tal como las ID SEC N°: 8, 12, 13, 14, 23, 24, 25, 26, o 9, 10). Con la expresión "sustancialmente la misma" afinidad, se significa que la afinidad o constante de disociación según se determina por las enseñanzas de la presente, no se incrementa o decrementa más que la variación inherente en el ensayo para un anticuerpo o fragmento que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 11 y una región de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 15, tal como la variación observada cuando el ensayo se lleva a cabo tres o más veces independientes. Con la expresión "sustancialmente la misma" especificidad del epítipo, se significa que la unión a una secuencia de aminoácidos que contiene el epítipo según se determina por las enseñanzas de la presente, se sitúa dentro de la variación inherente en el ensayo para un anticuerpo o fragmento que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 11 y una región de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 15, tal como la variación observada cuando el ensayo se lleva a cabo tres o más veces independientes. Cuando se efectúa una comparación con un anticuerpo o fragmento que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 11 y una región de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 15, se pretende significar que la comparación debería realizarse entre la secuencia de aminoácidos modificada y la secuencia de aminoácidos de partida con respecto a la cual se efectuaron una o más sustituciones, delecciones o adiciones, siendo dicha secuencia de partida idéntica en la totalidad del resto de aminoácidos.

Anticuerpos, anticuerpos humanizados, y anticuerpos modificados por ingeniería para humanos

Los anticuerpos de la presente invención de unión a la IL-1 β pueden proporcionarse en forma de anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAbs), anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados con CDR, anticuerpos plenamente humanos, anticuerpos de cadena única y/o anticuerpos biespecíficos, así como fragmentos, incluyendo variantes y derivados de los mismos, obtenidos mediante técnicas conocidas entre las

cuales se incluyen, aunque sin carácter limitativo, la escisión enzimática, la síntesis de péptidos o las técnicas recombinantes.

Los anticuerpos comprenden en general dos polipéptidos de cadena pesada y dos polipéptidos de cadena ligera, si bien también se contemplan anticuerpos de dominio único que tengan una cadena pesada y una cadena ligera y anticuerpos de cadena pesada desprovistos de cadenas ligeras. Hay cinco tipos de cadenas pesadas que se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, sobre la base de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de cadena pesada. Estos distintos 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, que son concretamente IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. Hay también dos tipos de cadenas ligeras, que son las llamadas kappa (κ) o lambda (λ) sobre la base de la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes. Un anticuerpo de longitud completa incluye un dominio constante y un dominio variable. No es necesario que la región constante esté presente en un fragmento de un anticuerpo que se une al antígeno. Los fragmentos de un anticuerpo aquí descrito de unión al antígeno pueden incluir fragmentos de anticuerpo Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v). Tal como se describe más detalladamente a continuación, los fragmentos de unión a la IL-1β abarcan fragmentos de anticuerpo y polipéptidos de unión a antígeno que se unirán a la IL-1β.

Cada una de las secuencias de cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo, o fragmento del mismo que se une al antígeno, incluye una región variable con tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs) así como regiones de entramado (FRs) que no son CDR. En el sentido en el que se las usa en la presente, las expresiones "cadena pesada" y "cadena ligera" significan la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera, respectivamente, a no ser que se indique lo contrario. A las CDRs de cadena pesada se les denomina aquí CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3. A las CDRs de cadena ligera se las denomina aquí CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3. Las regiones variables y las CDRs en una secuencia de anticuerpo se pueden identificar (i) según reglas generales que han sido desarrolladas en la técnica, o (ii) alineando las secuencias contra una base de datos de regiones variables conocidas. Los métodos para identificar estas regiones están descritos en Kontermann and Dubel, redactores en jefe, *Antibody Engineering*, Springer, Nueva York, NY, 2001, y Dinarello et al., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley and Sons Inc., Hoboken, NJ, 2000. Las bases de datos de secuencias de anticuerpos están descritas en y puede accederse a las mismas a través de la base de datos "The Kabatman" en www.bioinf.org.uk/abs (mantenida por A.C. Martin del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular del *University College London*, Londres, Inglaterra) y VBASE2 en www.vbase2.org, como se describe en Retter et al., *Nucl. Acids Res.*, 33 (edición de la base de datos): D671-D674 (2005). El sitio web de la base de datos "Kabatman" también incluye reglas empíricas generales para identificar CDRs. La expresión "CDR", en el sentido en el que se usa en la presente, es tal como se define en Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*, 5ª ed., U.S. Department of Health and Human Services, 1991, a no ser que se indique lo contrario.

La presente invención abarca anticuerpos de unión a la IL-1β que incluyen dos cadenas pesadas de longitud completa y dos cadenas ligeras de longitud completa. Como alternativa, los anticuerpos de unión a la IL-1β pueden ser constructos tales como anticuerpos de cadena única o "mini" anticuerpos que conservan actividad de unión a la IL-1β. Dichos constructos se pueden preparar por métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, la clonación y ensamblaje, mediados por PCR, 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, redactores en jefe, *Oxford University Press*, 1996). En este tipo de constructo, las partes variables de las cadenas pesadas y ligeras de una molécula de anticuerpo son amplificadas por PCR a partir de ADNc. Los amplicones resultantes son entonces ensamblados, por ejemplo, en un segundo paso de PCR, por medio de un ADN enlazador que codifica un enlazador de proteína flexible compuesto por los aminoácidos Gly y Ser. Este enlazador permite que las partes variables de cadena pesada y ligera se plieguen de forma tal que el bolsillo de unión del antígeno se regenera y el antígeno se une con afinidades frecuentemente comparables a las de la molécula progenitora de inmunoglobulina dimérica de longitud completa.

Los anticuerpos y fragmentos de la presente invención de unión a la IL-1β abarcan variantes de los ejemplos de anticuerpos, fragmentos y secuencias que aquí se dan a conocer. Las variantes incluyen péptidos y polipéptidos que comprenden una o más sustituciones, delecciones y/o adiciones de secuencias de aminoácidos que tienen la misma o sustancialmente la misma afinidad y especificidad de unión al epítipo que uno o más de los ejemplos de anticuerpos, fragmentos y secuencias que aquí se dan a conocer. Así, las variantes incluyen péptidos y polipéptidos que comprenden una o más sustituciones, delecciones y/o adiciones de secuencias de aminoácidos en los ejemplos de anticuerpos, fragmentos y secuencias que aquí se dan a conocer, donde dichas sustituciones, delecciones y/o adiciones no ocasionan variaciones sustanciales de la afinidad y especificidad de unión al epítipo. Por ejemplo, una variante de un anticuerpo o fragmento puede ser resultado de una o más variaciones de un anticuerpo o fragmento que comprenda una o más de las secuencias de aminoácidos de ID SEC N°: 8, 12, 13, 14, 15, 23, 24, 25, o 9, 10 u 11, donde el anticuerpo o fragmento que ha variado tiene la misma o sustancialmente la misma afinidad y especificidad de unión al epítipo que la secuencia de partida. Las variantes pueden darse de forma natural, tales como las variantes alélicas o de corte y empalme, o pueden ser construidas artificialmente. Las variantes pueden prepararse a partir de las correspondientes moléculas de ácido nucleico que codifican dichas variantes. Las variantes de los presentes anticuerpos y fragmentos de unión a la IL-1β pueden tener modificaciones en secuencias de aminoácidos de cadena ligera y/o pesada que se den de

manera natural o sean introducidas mediante modificación por ingeniería *in vitro* de secuencias nativas usando técnicas de ADN recombinante. Las variantes que se dan de manera natural incluyen variantes "somáticas" que son generadas in vivo en las correspondientes secuencias nucleotídicas de la línea germinal durante la generación de la respuesta de un anticuerpo a un antígeno foráneo.

5 Las variantes de los anticuerpos de unión a la IL-1 β y de los fragmentos de unión a la IL-1 β pueden también ser preparadas mediante técnicas de mutagénesis. Por ejemplo, pueden introducirse cambios de aminoácidos aleatoriamente por toda una región codificadora de un anticuerpo y las variantes resultantes se pueden cribar con respecto a la afinidad de unión para la IL-1 β o con respecto a otra propiedad. Como alternativa, pueden introducirse cambios de aminoácidos en regiones seleccionadas de un anticuerpo para IL-1 β , tal como en las CDRs de cadena ligera y/o pesada, y/o en las regiones de entramado, y los anticuerpos resultantes se pueden cribar con respecto a la unión a la IL-1 β o con respecto a alguna otra actividad. Los cambios de aminoácidos abarcan una o más sustituciones de aminoácidos en una CDR, que van desde una única diferencia de aminoácido hasta la introducción de múltiples permutaciones de aminoácidos dentro de una CDR dada, tal como la CDR3. En otro método, la contribución de cada residuo dentro de una CDR a la unión a la IL-1 β se puede valorar sustituyendo al menos un residuo dentro de la CDR por alanina. Lewis et al. (1995), *Mol. Immunol.* 32: 1065-72. Los residuos que no sean óptimos para la unión a la IL-1 β pueden ser entonces cambiados con el fin de determinar una secuencia más óptima. También se incluyen variantes generadas mediante inserción de aminoácidos para incrementar el tamaño de una CDR, tal como la CDR3. Por ejemplo, la mayoría de las secuencias CDR3 de cadena ligera tiene una longitud de nueve aminoácidos. Las secuencias de cadena ligera en un anticuerpo que sean más cortas que nueve residuos se pueden optimizar para la unión a la IL-1 β mediante la inserción de aminoácidos apropiados para incrementar la longitud de la CDR.

También pueden prepararse variantes mediante "reordenamiento de cadenas" realizada con cadenas ligeras o pesadas. Marks et al. (1992), *Biotechnology* 10: 779-83. Una única cadena ligera (o pesada) puede ser combinada con una biblioteca que tenga un repertorio de cadenas pesadas (o ligeras), y la población resultante se criba con respecto a una actividad deseada, tal como la unión a la IL-1 β . Esto permite cribar una mayor muestra de distintas cadenas pesadas (o ligeras) en combinación con una única cadena ligera (o pesada) en comparación con la que es posible con bibliotecas que comprendan repertorios de cadenas tanto pesadas como ligeras.

30 Los anticuerpos y fragmentos de la presente invención de unión a la IL-1 β abarcan derivados de los ejemplos de anticuerpos, fragmentos y secuencias que aquí se dan a conocer. Los derivados incluyen polipéptidos o péptidos, o variantes, fragmentos o derivados de los mismos, que han sido modificados químicamente. Los ejemplos incluyen la fijación covalente de uno o más polímeros, tales como polímeros hidrosolubles, carbohidratos enlazados a N o enlazados a O, azúcares, fosfatos y/u otras moléculas de este tipo. Los derivados se modifican de una manera que es distinta de los péptidos o polipéptidos de partida o que se dan de manera natural, o bien en cuanto al tipo o bien en cuanto a la ubicación de las moléculas fijadas. Los derivados adicionalmente incluyen la delección de uno o más grupos químicos que estén de manera natural presentes en el péptido o polipéptido.

40 Los anticuerpos y fragmentos de la presente invención de unión a la IL-1 β pueden ser biespecíficos. Los anticuerpos o fragmentos biespecíficos pueden ser de varias configuraciones. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden recordar a los anticuerpos (o fragmentos de anticuerpo) individuales, pero tienen dos sitios de unión a antígenos diferentes (regiones variables). Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante técnicas químicas (Kranz et al. (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 78: 5807), mediante técnicas de "polidoma" (Pat. U.S. N° 4.474.893) o mediante técnicas de ADN recombinante. Los anticuerpos biespecíficos de la presente invención pueden tener especificidades de unión para al menos dos epítomos diferentes, al menos uno de los cuales es un epítipo de IL-1 β . Los anticuerpos y fragmentos de unión a la IL-1 β pueden también ser heteroanticuerpos. Los heteroanticuerpos son dos o más anticuerpos, o fragmentos de unión de anticuerpo (Fab) enlazados mutuamente, teniendo cada anticuerpo o fragmento una especificidad diferente.

50 Se contemplan para los presentes anticuerpos y fragmentos de unión a la IL-1 β técnicas para crear versiones de ADN recombinante de las regiones de unión al antígeno de moléculas de anticuerpos que eluden la generación de anticuerpos monoclonales. El ADN se clona en un sistema de expresión bacteriano. Un ejemplo de una técnica de este tipo que es adecuada para la puesta en práctica de esta invención hace uso de un sistema vector lambda bacteriófago que tiene una secuencia líder que hace que la proteína Fab expresada migre al espacio periplásmico (entre la membrana de la célula bacteriana y la pared celular) o que sea secretada. Pueden generarse y cribarse rápidamente grandes números de fragmentos Fab funcionales para seleccionar aquellos que se unan a la IL-1 β . Dichos agentes de unión a la IL-1 β (fragmentos Fab con especificidad para un polipéptido IL-1 β) quedan específicamente incluidos dentro de los anticuerpos y fragmentos de la presente invención de unión a la IL-1 β .

60 Los presentes anticuerpos y fragmentos de unión a la IL-1 β pueden ser anticuerpos humanizados o modificados por ingeniería para humanos. En el sentido que se le da en la presente, un anticuerpo humanizado, o un fragmento del mismo que se une al antígeno, es un polipéptido recombinante que comprende una parte de un sitio de un anticuerpo no humano que se une al antígeno y una parte de las regiones constantes y/o de entramado de un anticuerpo humano. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo modificado por ingeniería para humanos es un anticuerpo no humano (p. ej. de

ratón) que se ha alterado por ingeniería modificando (p. ej. delecionando, insertando o sustituyendo) aminoácidos en posiciones específicas para reducir o eliminar toda inmunogenicidad detectable del anticuerpo modificado en un humano.

- 5 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 enlazada a una región constante humana. Así, en los anticuerpos quiméricos la región variable es mayormente no humana, y la región constante es humana. Se describen anticuerpos quiméricos y métodos para materializarlos en Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 81: 6841-6855 (1984), Boulianne et al., *Nature*, 312: 643-646 (1984) y en la Publicación de Solicitud PCT WO 10 86/01533. A pesar de que pueden ser menos inmunogénicos que un anticuerpo monoclonal de ratón, las administraciones de anticuerpos quiméricos han venido siendo asociadas a respuestas inmunes humanas (HAMA) para la parte no humana de los anticuerpos. Los anticuerpos quiméricos también se pueden producir cortando y empalmado los genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad apropiada de unión al antígeno junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada, tal como la capacidad de activar el complemento humano y mediar la ADCC. Morrison et al. (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81: 6851; Neuberger et al. (1984), *Nature*, 15 312:604. Un ejemplo es la sustitución de una región Fc por la de un isotipo diferente.

- Los anticuerpos injertados con CDR son anticuerpos que incluyen las CDRs de un anticuerpo "donante" no humano enlazadas a la región de entramado de un anticuerpo "receptor" humano. En general, los anticuerpos injertados con CDR incluyen más secuencias de anticuerpo humano que los anticuerpos quiméricos porque incluyen tanto secuencias de región constante como secuencias de región variable (de entramado) de anticuerpos humanos. Así por ejemplo, un anticuerpo humanizado injertado con CDR de la invención puede comprender una cadena pesada que comprenda una secuencia de aminoácidos contiguos (p. ej. aproximadamente 5 ó más, 10 ó más o incluso 15 ó más residuos de aminoácidos contiguos) de la región de entramado de un anticuerpo humano (como p. ej. la FR-1, la FR-2 ó la FR-3 de un anticuerpo humano) u opcionalmente la mayor parte o la totalidad de la región de entramado de un anticuerpo humano. Se describen anticuerpos injertados con CDR y métodos para materializarlos en Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986), Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988) y Verhoeven et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988). Métodos que se pueden usar para producir anticuerpos humanizados también están descritos en las Patentes U.S. 4.816.567, 5.721.367, 5.837.243 y 6.180.377. Se considera que, en comparación con los anticuerpos quiméricos, es 20 menos probable que los anticuerpos injertados con CDR induzcan una reacción inmune contra partes de anticuerpos no humanos. Sin embargo se ha descrito que las secuencias de entramado de los anticuerpos donantes son necesarias para la afinidad y/o especificidad de unión del anticuerpo donante, presumiblemente porque estas secuencias de entramado afectan al plegamiento de la parte de unión al antígeno del anticuerpo donante. Por consiguiente, cuando secuencias de CDR no humanas donantes se injertan en secuencias de entramado humanas inalteradas, el anticuerpo 30 injertado con CDR resultante puede presentar, en algunos casos, pérdida de afección de unión con respecto al anticuerpo donante no humano original. Véanse, p. ej., Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988) y Verhoeven et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988).

- Los anticuerpos modificados por ingeniería para humanos incluyen anticuerpos "revestidos" y anticuerpos preparados usando la tecnología HUMAN ENGINEERING™ (XOMA (US) LLC, Berkeley, CA). La tecnología HUMAN ENGINEERING™ está disponible comercialmente y supone alterar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo quimérico o de ratón, haciendo cambios específicos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo para producir un anticuerpo modificado con inmunogenicidad reducida en un humano, que sin embargo conserve las propiedades de unión deseables de los anticuerpos no humanos originales. En general, la 45 técnica supone clasificar residuos de aminoácidos de un anticuerpo no humano (p. ej. de ratón) como residuos "de bajo riesgo", "de riesgo moderado" o "de alto riesgo". La clasificación se lleva a cabo usando un cálculo de riesgo/recompensa global que evalúa los beneficios previstos de efectuar una determinada sustitución (p. ej. para inmunogenicidad en humanos) contra el riesgo de que la sustitución afecte a las propiedades de plegamiento y/o unión a antígeno del anticuerpo resultante. Así, una posición de bajo riesgo es una para la cual se prevea que una sustitución será beneficiosa debido a que se prevé que reducirá la inmunogenicidad sin afectar significativamente a las propiedades de unión al antígeno. Una posición de riesgo moderado es una para la cual se prevé que una sustitución reducirá la inmunogenicidad, pero es más probable que afecte al plegamiento de la proteína y/o a la unión al antígeno. Las posiciones de alto riesgo contienen residuos que es sumamente probable que estén implicados en el plegamiento o la unión al antígeno apropiados. En general, las posiciones de bajo riesgo en un anticuerpo no humano se sustituyen con 50 residuos humanos, las posiciones de alto riesgo raramente se sustituyen, y en ocasiones se llevan a cabo sustituciones humanizantes en posiciones de riesgo moderado, aunque no indiscriminadamente. Las posiciones con prolinas en la secuencia de región variable de anticuerpo no humano se clasifican habitualmente como posiciones de riesgo al menos moderado.

- 60 El residuo de aminoácido humano particular a ser sustituido en una posición determinada de bajo riesgo o de riesgo moderado de una secuencia de anticuerpo no humano (p. ej. de ratón) se puede seleccionar 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 bajo riesgo o de riesgo moderado en la secuencia no humana pueden usarse en sustitución de los correspondientes residuos en la secuencia

de anticuerpo humano según la alineación. Las técnicas para materializar proteínas modificadas por ingeniería para humanos se describen más detalladamente en Studnicka et al., *Protein Engineering*, 7: 805-814 (1994), en las Patentes U.S. 5.766.886, 5.770.196, 5.821.123 y 5.869.619, y en la Publicación de Solicitud PCT WO 93/11794.

5 Los anticuerpos "revestidos" son anticuerpos no humanos o humanizados (p. ej. anticuerpos quiméricos o injertados con CDR) que han sido modificados por ingeniería para sustituir ciertos residuos de aminoácidos expuestos al solvente con el fin de reducir adicionalmente su inmunogenicidad o potenciar su función. Puesto que se presume que los residuos superficiales de un anticuerpo quimérico es menos probable que afecten al correcto plegamiento del anticuerpo y es más probable que provoquen una reacción inmune, el revestimiento de un anticuerpo quimérico puede incluir, por ejemplo, identificar residuos expuestos al solvente en la región de entramado no humana de un anticuerpo quimérico y sustituir al menos uno de ellos con los correspondientes residuos superficiales de una región de entramado humana. El revestimiento puede llevarse a cabo mediante cualquier técnica adecuada de modificación por ingeniería, incluyendo el uso de la tecnología HUMAN ENGINEERING™ anteriormente descrita.

15 En un enfoque distinto, puede lograrse una recuperación de avidez de unión "deshumanizando" un anticuerpo injertado con CDR. La deshumanización puede incluir la restitución de residuos de regiones de entramado del anticuerpo donante al anticuerpo injertado con CDR, restituyendo con ello el correcto plegamiento. Puede lograrse una "deshumanización" similar (i) incluyendo partes de la región de entramado "donante" en el anticuerpo "receptor" o (ii) injertando partes de la región de entramado del anticuerpo "donante" en el anticuerpo receptor (junto con las CDRs donantes injertadas).

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

25 Los ejemplos de anticuerpos humanizados o modificados por ingeniería para humanos 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 o un fragmento definido de IgG, tal como al menos uno de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 ó IgG4. Como ejemplo adicional, los presentes anticuerpos o fragmentos pueden comprender una cadena pesada de IgG1 y una cadena ligera de IgG1.

Los presentes anticuerpos y fragmentos pueden ser anticuerpos humanos, tales como anticuerpos que se unan a polipéptidos IL-1 β y sean codificados por secuencias de ácido nucleico las cuales sean variantes somáticas, que se den de manera natural, de secuencia de ácido nucleico de inmunoglobulina de línea germinal humana, y fragmentos, variantes sintéticas, derivados y fusiones de los mismos. Dichos anticuerpos pueden ser producidos por cualquier método conocido en la técnica, tal como mediante el uso de mamíferos transgénicos (tales como ratones transgénicos) en los cuales el repertorio de inmunoglobulinas nativas ha sido sustituido con genes V humanos del cromosoma del mamífero. Dichos mamíferos parecen llevar a cabo una recombinación VDJ y una hipermutación somática de los genes de anticuerpo de la línea germinal humana de manera normal, produciendo así anticuerpos de alta afinidad con secuencias completamente humanas.

Los anticuerpos humanos pueden también ser generados mediante el cribaje in vitro de bibliotecas de anticuerpos de presentación en fagos. Véanse Hoogenboom et al. (1991), *J. Mol. Biol.* 227: 381; y Marks et al. (1991), *J. Mol. Biol.* 222: 581. Han sido descritas y pueden ser preparadas fácilmente varias bibliotecas de presentación en fagos que contienen anticuerpos. Las bibliotecas pueden contener una diversidad de secuencias de anticuerpos humanos, tales como fragmentos Fab, Fv y scFv humanos, que pueden ser cribadas contra una diana apropiada. Las bibliotecas de presentación de fagos pueden comprender péptidos o proteínas que no sean anticuerpos, que se pueden cribar para identificar agentes de unión selectiva de la IL-1 β .

Los anticuerpos y fragmentos de unión a la IL-1 β pueden comprender una o más partes que no se unan a la IL-1 β sino que en lugar de ello sean responsables de otras funciones, tales como la vida media circulante, el efecto citotóxico directo, el etiquetado detectable o la activación de la cascada endógena del complemento o la citotoxicidad celular endógena del receptor. Los anticuerpos o fragmentos pueden comprender la totalidad o una parte de la región constante y pueden ser de cualquier isotipo, incluyendo los IgA (p. ej. IgA1 ó IgA2), IgD, IgE, IgG (p. ej. IgG1, IgG2, IgG3 ó IgG4) o IgM. Además o en lugar de comprender una región constante, los compuestos de la invención de unión al antígeno pueden incluir un epítipo etiqueta, un epítipo de un receptor de rescate, una fracción etiquetadora con fines diagnósticos o de purificación, o una fracción citotóxica tal como un radionucleido o toxina.

La región constante (cuando esté presente) de los presentes anticuerpos y fragmentos puede ser del tipo γ 1, γ 2, γ 3, γ 4, μ , β 2 ó δ o ϵ , preferiblemente del tipo γ , más preferiblemente del tipo μ , mientras que la parte constante de una cadena ligera humana puede ser del tipo κ o λ (lo cual 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, donde la región Fc modificada comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo salvaje. La

región Fc variante puede estar diseñada, con respecto a una molécula equiparable que comprenda la región Fc de tipo salvaje, para unirse a receptores Fc con mayor o menor afinidad.

Por ejemplo, los presentes anticuerpos y fragmentos de unión a la IL-1 β pueden comprender una región Fc modificada. Región Fc se refiere a polipéptidos sintéticos o que se dan de manera natural homólogos al dominio C-terminal de IgG que se produce al tener lugar la digestión con papaína de IgG. La Fc de las IgG tiene un peso molecular de aproximadamente 50 kD. En los presentes anticuerpos y fragmentos puede usarse una región Fc entera, o solamente una parte potenciadora de la vida media. Adicionalmente son aceptables muchas modificaciones de la secuencia de aminoácidos, puesto que no en todos los casos es necesaria o deseada la actividad nativa.

La región Fc se puede mutar, si se desea, para inhibir su capacidad de fijar el complemento y unirse al receptor Fc con alta afinidad. Para Fc de IgG murina, la sustitución de Glu 318, Lys 320 y Lys 322 por Ala hace que la proteína sea incapaz de dirigir la ADCC. La sustitución de Leu 235 por Glu inhibe la capacidad de la proteína de unirse al receptor Fc con alta afinidad. También son conocidas varias mutaciones para las IgG humanas (véanse, p. ej., 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 están provistos de una región Fc modificada donde una región Fc que se da de manera natural es modificada 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 mediante un ensayo *in vitro*. También se describen en la Patente U.S. Nº 6.998.253 métodos para alterar la forma original de una región Fc de una IgG.

En ciertas realizaciones puede ser deseable modificar el anticuerpo o fragmento con el fin de incrementar su vida media en suero, por ejemplo adicionando moléculas tales como PEG u otros polímeros hidrosolubles, incluyendo polímeros polisacáridos, a fragmentos de anticuerpo para incrementar la vida media. Esto puede también lograrse, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítipo de unión del receptor de rescate al fragmento de anticuerpo (p. ej. mediante mutación de la región apropiada del fragmento de anticuerpo o incorporando el epítipo a una etiqueta peptídica que a continuación se fusiona con el fragmento de anticuerpo en cualquier extremo o en el centro, p. ej. mediante síntesis de péptidos o de ADN) (véase la Publicación Internacional Nº WO 96/32478). Epítipo de unión del receptor de rescate se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (p. ej. IgG₁, IgG₂, IgG₃ ó IgG₄) que es responsable de incrementar la vida media en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

Un epítipo de unión del receptor de rescate puede incluir una región en la que cualquier o cualesquiera residuos de aminoácido de uno o dos bucles de un dominio Fc son transferidos a una posición análoga del fragmento de anticuerpo. Aún más preferiblemente, son transferidos tres o más residuos de uno o dos bucles del dominio Fc. Todavía más preferiblemente, el epítipo se toma del dominio CH2 de la región Fc (p. ej. de una IgG) y se transfiere a la región CH1, CH3 ó VH, o a más de una región de este tipo, del anticuerpo. Como alternativa, el epítipo se toma del dominio CH2 de la región Fc y se transfiere a la región CL o a la región VL, o a ambas, del fragmento del anticuerpo. Véanse también las solicitudes internacionales WO 97/34631 y WO 96/32478, que describen variantes de Fc y su interacción con el receptor de rescate.

La mutación de residuos dentro de sitios de unión del receptor Fc puede redundar en una función efectora alterada, tal como una actividad de ADCC o de CDC alterada, o una vida media alterada. Las potenciales mutaciones incluyen la inserción, delección o sustitución de uno o más residuos, incluyendo la sustitución con alanina, una sustitución conservadora, una sustitución no conservadora o una sustitución con un correspondiente residuo de aminoácido en la misma posición de una subclase de IgG diferente (p. ej. la sustitución de un residuo de IgG1 con un residuo de IgG2 correspondiente en esa posición). Por ejemplo se ha descrito que la mutación de la serina en la posición de aminoácido 241 en la IgG4 a prolina (que se encuentra en esa posición en la IgG1 y en la IgG2) condujo a la producción de un anticuerpo homogéneo, así como a una prolongación de la vida media en suero y a un mejoramiento de la distribución tisular en comparación con la IgG4 quimérica original. (Angal et al., *Mol Immunol.* 30:105-8, 1993).

Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención no presenta reactividad cruzada con diana alguna que no sea la IL-1 β . Por ejemplo, los presentes anticuerpos y fragmentos preferiblemente no se unen de manera detectable a la IL-1 α .

Anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a la IL-1 β

Los fragmentos de anticuerpo son partes de un anticuerpo intacto de longitud completa tales como una región variable o de unión a antígeno, del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única (p. ej. scFv); fragmentos de anticuerpo multispecífico tales como anticuerpos biespecíficos, triespecíficos y multispecíficos (p. ej. diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos); minicuerpos; anticuerpos recombinantes quelantes; tricuerpos o bicuerpos; intracuerpos; nanocuerpos; pequeños productos inmunofarmacéuticos modulares (SMIP), proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión; anticuerpos camelizados; anticuerpos con contenido de V_HH; y cualesquiera otros polipéptidos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La invención proporciona un anticuerpo que se une a IL-1 β o fragmento del mismo que se une a IL-1 β , en el que el anticuerpo o fragmento se une a IL-1 β humana con una constante de disociación de menos de 1 pM, y en el que el anticuerpo o fragmentos de unión se unen substancialmente al mismo epítopo que un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 11 y una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 15 a la que se une.

La Fig. 1 ilustra la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 2. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 21, y más preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 8. Los anticuerpos de la presente invención también pueden comprender la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 12 ó ID SEC N°: 13, y preferiblemente comprenden la ID SEC N°: 14 ó la ID SEC N°: 15. Típicamente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, y la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 4-8, o 12-15. La cadena ligera del anticuerpo preferiblemente comprende, está compuesta esencialmente por, o está compuesta por la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 9, ID SEC N°: 10 ó ID SEC N°: 11. También se prefiere un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (como p. ej. una región variable de cadena pesada de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo) que comprende, está compuesto esencialmente por, o está compuesto por la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 23 ó ID SEC N°: 24 (p. ej. la ID SEC N°: 25 ó la ID SEC N°: 26).

La invención proporciona un anticuerpo que se une a la IL-1 β o un fragmento del mismo que se une a la IL-1 β , que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una de las secuencias de aminoácidos de ID SEC N°: 23 ó 24, como alternativa una de las secuencias de aminoácidos de ID SEC N°: 12, 13, 23 ó 24, o como alternativa la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 12 o 13, o como alternativa la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 13, o como alternativa la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 8, 14 ó 15, o como alternativa la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 8 ó 15. Típicamente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera, que preferiblemente está compuesta por la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 9, ID SEC N°: 10 ó ID SEC N°: 11. A título de ejemplo, un anticuerpo preferido comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 8 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 11.

Las Figs. 2, 3 y 4 exponen las regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos que se describen en el contexto de la invención, cuyas secuencias se corresponden con anticuerpos que aquí se denominan AB1, AB2, AB3, AB4, AB5, AB5.1, AB5.2, AB5.3 y AB5.4. Las secuencias AB5.1, AB5.2, AB5.3 y AB5.4 contienen posiciones variables, designadas como X1 y X2, en la región CDR3 de cadena pesada. Estas posiciones variables pueden ser cualesquiera de los aminoácidos indicados. Preferiblemente, X1 y X2 son respectivamente alanina y arginina, valina y arginina, fenilalanina y arginina, lisina y lisina, o asparagina y arginina.

AB5.1 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 12 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 10. AB5.2 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 13 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 11. AB5.3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 23 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 10. AB5.4 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 24 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 11.

La presente invención abarca fragmentos de anticuerpo de unión a la IL-1 β que comprenden secuencias de cadena pesada o ligera de ID SEC N°: 8, 12, 13, 14, 15, 23, 24, 25, 26 o 9, 10, 11 y que se unen la IL-1 β . En el sentido en el que se usa en la presente, el término fragmentos se refiere a cualesquiera 3 ó más aminoácidos contiguos (como p. ej. 4 ó más, 5 ó más, 6 ó más, 8 ó más, o incluso 10 ó más aminoácidos contiguos) del anticuerpo e incluye los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v), o las regiones variables de cadena ligera o pesada individuales o parte de los mismos. Los fragmentos de unión a la IL-1 β incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y scFv. Estos fragmentos carecen del fragmento Fc de un anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación, y pueden presentar menos unión tisular 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 bien conocidos, por ejemplo mediante escisión proteolítica con enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂).

La presente invención abarca anticuerpos de unión a IL-1 β y fragmentos de los mismos de unión a IL-1 β , que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 9, 10 u 11, y la región de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 8, 12, 13, 14, 15, 23, 24, 25 o 26 que se unen selectivamente al ligando de IL-1 β , pero permiten o sustancialmente permiten la unión del ligando de IL-1 β unido, al receptor tipo I de IL-1 (IL-1RI) (véanse el Ejemplo 14 y las Figs. 19 y 20). En contraposición a muchos anticuerpos, incluyendo varios anticuerpos de unión a IL-1 β conocidos, los anticuerpos denominados AB5 y

AB7 se unen selectivamente al ligando de IL-1 β , aunque no bloquean o sustancialmente no bloquean la unión de IL-1 β a IL-1RI, según se muestra en el Ejemplo 14. Por ejemplo, el anticuerpo denominado AB7 se une a un epítipo de IL-1 β aunque sigue permitiendo que la IL-1 β unida se una a IL-1RI. Así, la presente invención abarca anticuerpos o fragmentos de unión a IL-1 β que se unen a un epítipo de IL-1 β de tal manera que el anticuerpo o fragmento unido permite o sustancialmente permite que la IL-1 β se una al receptor I de IL-1 (IL-1RI), y el anticuerpo o fragmento se une a IL-1 β humana con una constante de disociación menor que 3 pM.

Están perfectamente descritos en la técnica ensayos *in vitro* y basados en células que están destinados a ser usados para determinar la unión de IL-1 β al receptor tipo I de IL-1, incluyendo ensayos para efectuar dicha determinación en presencia de moléculas (tales como anticuerpos, antagonistas u otros inhibidores) que se unen a la IL-1 β o al IL-1RI (véanse, 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. EE.UU.* 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 tipo I de IL-1 recombinante, incluyendo el receptor tipo I de IL-1 humana, para dichos ensayos puede ser fácilmente obtenido a partir de una variedad de fuentes comerciales (véase, por ejemplo, *R&D Systems*, SIGMA). El receptor tipo I de IL-1 también puede ser expresado a partir de un vector o constructo de expresión introducido en una célula huésped apropiada usando técnicas de transfección y biología molecular convencionales que son conocidas en el ramo. El receptor tipo I de IL-1 expresado a continuación se puede aislar y purificar para ser usado en ensayos de unión, o como alternativa para ser usado directamente en una forma asociada a una célula.

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

Para otros ensayos de unión de IL-1 β / IL-1RI, puede determinarse si se permite o se bloquea la unión de la IL-1 β al receptor tipo I de IL-1 comparando la unión de IL-1 β a IL-1RI en presencia o en ausencia de anticuerpos para IL-1 β o fragmentos de los mismos de unión a la IL-1 β . El bloqueo se identifica en la lectura del ensayo como una reducción designada de la unión de IL-1 β al receptor tipo I de IL-1 en presencia de anticuerpos anti-IL-1 β o de fragmentos de los mismos de unión a la IL-1 β , en comparación con una muestra de control que contiene el tampón o diluyente correspondiente pero no un anticuerpo para IL-1 β o un fragmento del mismo que se une a la IL-1 β . La lectura del ensayo puede verse cualitativamente como indicación de la presencia o ausencia de bloqueo, o puede verse cuantitativamente como indicación de una reducción porcentual o numérica de la unión debida a la presencia del anticuerpo o fragmento.

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

La presente invención se dirige a anticuerpos de unión a la IL-1 β o fragmentos de unión a la IL-1 β que se unen a IL-1 β humano con una constante de disociación de menos de 1 pM, y en el que el anticuerpo o fragmentos de unión se unen a sustancialmente el mismo epítipo que un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 11 y una región de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 15 a la que se une. Como alternativa o bien adicionalmente, los anticuerpos de unión a la IL-1 β o los fragmentos de unión a la IL-1 β compiten con la unión de un anticuerpo que tenga la región variable de cadena ligera de ID SEC N°: 11 y la región variable de cadena pesada de ID SEC N°: 15. Como alternativa o bien adicionalmente, la presente invención abarca anticuerpos y fragmentos de unión a la IL-1 β que se unen a un epítipo contenido en la secuencia de aminoácidos ESDVPKNYPKKKMEKRFVFNKIE (ID SEC N°: 36), un epítipo al que se

unen los anticuerpos denominados AB5 y AB7. Tal como se contempla en la presente, puede determinarse fácilmente si un anticuerpo o fragmento de unión a la IL-1 β se une al mismo epítipo o sustancialmente el mismo epítipo que uno o más de los ejemplos de anticuerpos, tales como por ejemplo el anticuerpo denominado AB7, usando cualesquiera de los diversos métodos que son conocidos en la técnica.

Por ejemplo, los residuos de aminoácidos clave (epítipo) a los que se unen un anticuerpo o fragmento de unión a la IL-1 β pueden determinarse usando un conjunto de péptidos de manera similar al método que se describe en el Ejemplo 11. Se sintetiza directamente sobre una membrana un conjunto de péptidos, tal como por ejemplo un conjunto de péptidos PepSpotTM (JPT Peptide Technologies, Berlín, Alemania), en donde un registro de doce péptidos de aminoácidos abarca toda la secuencia de aminoácidos de la IL-1 β , solapándose cada péptido en 11 aminoácidos con el anterior. La membrana portadora de los péptidos se sondea a continuación con el anticuerpo para lo cual se busca información de unión al epítipo, por ejemplo a una concentración de 2 μ g/ml, por espacio de 2 h a temperatura ambiente. La unión del anticuerpo a péptidos unidos a la membrana se puede detectar usando un anticuerpo secundario anti-humano de cabra (o de ratón, cuando ello sea apropiado) conjugado con HRP, seguido por quimioluminiscencia mejorada (ECL). La(s) mancha(s) peptídica(s) que se corresponde(n) con residuos o secuencias de aminoácidos particulares de la proteína IL-1 β madura, y que puntúan positivamente en relación con la unión del anticuerpo, son indicativas del epítipo al que se une el anticuerpo particular.

Pueden llevarse a cabo experimentos de competición de anticuerpos, y dichos ensayos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo o fragmento se une a un epítipo contenido en una secuencia peptídica que comprende los aminoácidos ESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIE, que se corresponde con los residuos 83 a 105 de la proteína IL-1 β madura, un anticuerpo de especificidad desconocida puede ser comparado con anticuerpo AB7 de la presente invención, que se sabe que se une a un epítipo contenido dentro de esta secuencia. Los ensayos de competición por la unión pueden ser llevados a cabo por ejemplo usando un instrumento Biacore[®] para análisis cinético de interacciones de unión, o por ELISA. En un ensayo de este tipo, el anticuerpo de especificidad desconocida para el epítipo es evaluado en cuanto a su capacidad para competir por la unión contra el anticuerpo comparador conocido (p. ej. el AB7). La competición por la unión a un epítipo en particular es determinada mediante una reducción de la unión al epítipo de IL-1 β de al menos aproximadamente un 50%, o de al menos aproximadamente un 70%, o de al menos aproximadamente un 80%, o de al menos aproximadamente un 90%, o de al menos aproximadamente un 95%, o de al menos aproximadamente un 99% o de al menos aproximadamente un 100% para el anticuerpo comparador conocido (p. ej. el AB7) y es indicativa de la unión a sustancialmente el mismo epítipo.

En vista de la identificación en esta exposición de regiones de unión a la IL-1 β en ejemplos de anticuerpos y/o epítopos reconocidos por los anticuerpos dados a conocer, se contempla que pueden generarse anticuerpos adicionales con características de unión y utilidad terapéutica o diagnóstica similares que igualen a las realizaciones de esta exposición.

Además, los anticuerpos y fragmentos para IL-1 β de la presente invención abarcan cualesquiera de las secuencias de aminoácidos anteriores de las cadenas ligeras o pesadas con una o más sustituciones conservadoras (p. ej. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 sustituciones conservadoras). A la luz de la presente exposición, pueden determinarse las posiciones de una secuencia de aminoácidos que sean candidatos para sustituciones conservadoras, y pueden seleccionarse aminoácidos sintéticos y que se den de manera natural que efectúen sustituciones conservadoras para cualesquiera aminoácidos en particular. Las consideraciones para seleccionar las sustituciones conservadoras incluyen el contexto en el cual se efectúe cualquier sustitución de aminoácidos en particular, la hidrofobicidad o polaridad de la cadena lateral, el tamaño general de la cadena lateral y el valor pK de cadenas laterales con carácter ácido o básico bajo condiciones fisiológicas. Por ejemplo, la lisina, la arginina y la histidina a menudo se sustituyen adecuadamente entre ellas. Como es sabido en la técnica, esto es debido a que los tres aminoácidos tienen todos ellos cadenas laterales básicas, mientras que los valores pK para las cadenas laterales de la lisina y de la arginina son mucho más próximos entre sí (aproximadamente 10 y 12) que a la histidina (aproximadamente 6). Análogamente, la glicina, la alanina, la valina, la leucina y la isoleucina a menudo se sustituyen adecuadamente entre ellas, con la salvedad de que la glicina frecuentemente no sustituye de manera adecuada a los otros miembros del grupo. Esto es debido al hecho de que cada uno de estos aminoácidos es relativamente hidrófobo cuando se incorpora a un polipéptido, pero la carencia de un carbono α de la glicina les permite a los ángulos phi y psi de rotación (en torno al carbono α) tanta libertad conformacional que los residuos glicinilo pueden provocar cambios de conformación o estructura secundaria que no se producen a menudo cuando los otros aminoácidos son usados en sustitución unos de otros. Otros grupos de aminoácidos que frecuentemente son usados en adecuada sustitución unos de otros incluyen, aunque sin carácter limitativo, el grupo compuesto por ácidos glutámico y aspártico; el grupo compuesto por fenilalanina, tirosina y triptófano; y el grupo compuesto por serina, treonina y opcionalmente tirosina.

Realizando modificaciones conservadoras en la secuencia de aminoácidos o modificaciones correspondientes en los nucleótidos codificadores, pueden producirse anticuerpos de unión a la IL-1 β o fragmentos de unión a la IL-1 β que tienen características funcionales y químicas similares a las de los ejemplos de anticuerpos y fragmentos que aquí se dan a conocer. Por contraposición, pueden lograrse modificaciones sustanciales de las características funcionales y/o químicas de anticuerpos de unión a la IL-1 β o de fragmentos de unión a la IL-1 β seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal molecular en

la zona de la sustitución, por ejemplo como conformación laminar o helicoidal, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral.

Los fragmentos de un anticuerpo que se unen al antígeno incluyen fragmentos que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno, generalmente reteniendo la parte del anticuerpo que se une al antígeno. Está bien establecido que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser desempeñada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de partes que se unen al antígeno incluyen (i) un fragmento Fab, que es un fragmento monovalente compuesto por los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')², que es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd el cual es los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv el cual 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 complementariedad (CDR) aislada. Los anticuerpos de cadena única están también comprendidos dentro de la expresión parte de un anticuerpo de unión al antígeno. Los anticuerpos y fragmentos de la presente invención de unión a la IL-1 β también abarcan dominios de unión monovalentes o multivalentes, o monoméricos o multiméricos (p. ej. tetraméricos), derivados de CDR, con o sin un andamio (como por ejemplo un andamiaje de proteína o carbohidrato).

Los presentes anticuerpos o fragmentos de unión a la IL-1 β pueden ser parte de moléculas de inmunoadherencia mayores, formadas por la asociación covalente o no covalente del anticuerpo o de la parte del anticuerpo con otro u otros péptidos o proteínas. Los ejemplos de dichas moléculas de inmunoadherencia incluyen el uso de la región central de la estreptavidina para materializar una molécula scFv tetramérica (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 materializar moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S. M. et al. (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Los anticuerpos y fragmentos que comprenden moléculas de inmunoadherencia pueden ser obtenidos usando técnicas de ADN recombinante convencionales, tal como aquí se describe. Las partes de unión al antígeno preferidas son dominios completos o parejas de dominios completos.

Los anticuerpos y fragmentos de la presente invención de unión a la IL-1 β también abarcan fragmentos de anticuerpo de dominio (dAb) (Ward et al., *Nature* 341:544-546, 1989) que están compuestos por un dominio V_H. Los anticuerpos y fragmentos de la presente invención de unión a la IL-1 β también abarcan diacuerpos, que son anticuerpos bivalentes en los cuales se expresan dominios V_H y V_L en una única cadena polipeptídica, pero usando un enlazador que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, obligando con ello a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión al antígeno (véanse, p. ej., los documentos EP 404.097; WO 93/11161; Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90:6444-6448, 1993, y Poljak et al., *Structure* 2:1121-1123, 1994). Los diacuerpos pueden ser biespecíficos o mono-específicos.

Los anticuerpos y fragmentos de la presente invención de unión a la IL-1 β también abarcan fragmentos de anticuerpo de cadena única (scFv) que se unen a la IL-1 β . Un scFv comprende una región variable de cadena pesada de anticuerpo (V_H) enlazada operativamente a una región variable de cadena ligera de anticuerpo (V_L) en donde la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera, conjuntamente o de manera individual, forman un sitio de unión que se une a la IL-1 β . Un scFv puede comprender una región V_H en el extremo aminoterminal y una región V_L en el extremo carboxiterminal. Como alternativa, el scFv puede comprender una región V_L en el extremo aminoterminal y una región V_H en el extremo carboxiterminal. Además, a pesar de que los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, son codificados por genes independientes, los mismos pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite constituirse como una única cadena de proteína en la cual las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (lo que se conoce como Fv de cadena única (scFv); véanse, p. ej. Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; y Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85:5879-5883).

Un scFv puede de manera opcional comprender además un enlazador polipeptídico entre la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera. Dichos enlazadores polipeptídicos en general comprenden entre 1 y 50 aminoácidos, como alternativa entre 3 y 12 aminoácidos, como alternativa 2 aminoácidos. Un ejemplo de un péptido enlazador para enlazar cadenas pesadas y ligeras en un scFv comprende la secuencia de 5 aminoácidos Gly- Gly- Gly- Gly- Ser (ID SEC N°: 37). Otros ejemplos comprenden una o más repeticiones en tándem de esta secuencia (por ejemplo un polipéptido que comprende de dos a cuatro repeticiones de Gly- Gly- Gly- Gly- Ser (ID SEC N°: 37)) para crear enlazadores.

Los anticuerpos y fragmentos de la presente invención de unión a la IL-1 β también abarcan anticuerpos de cadena pesada (HCAb). Se dan excepciones a la estructura H₂L₂ de anticuerpos convencionales en algunos isotipos de las inmunoglobulinas que se encuentran en camélidos (camellos, dromedarios y llamas; Hamers-Casterman et al., 1993 *Nature* 363: 446; Nguyen et al., 1998 *J. Mol. Biol.* 275: 413), en tiburones alfombra (*wobbegong sharks*) (Nuttall et al., *Mol Immunol.* 38:313-26, 2001), en 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 (*spotted ratfish*) (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 al antígeno usando solamente regiones variables de cadena pesada, por cuanto estos

anticuerpos funcionales son dímeros de cadenas pesadas solamente (a los que se denomina "anticuerpos de cadena pesada" o "HCAbs"). En consecuencia, algunas realizaciones de los presentes anticuerpos y fragmentos de unión a la IL-1 β pueden ser anticuerpos de cadena pesada (HCAb) que se unen específicamente a la IL-1 β . Por ejemplo, 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 HCAbs 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 constan solamente de los dominios variables de cadena pesada, a los que a menudo se denomina V_{HH} para distinguirlos de los V_H convencionales. Muyldermans et al., *J. Mol. Recognit.* 12: 131-140 (1999). Al dominio variable de los anticuerpos de cadena pesada se le denomina en ocasiones nanocuerpo (Cortez-Retamozo et al., *Cancer Research* 64:2853-57, 2004). Se puede generar 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.

Puesto que el primer dominio constante (C_{H1}) está ausente (eliminado por corte durante el procesamiento de ARNm debido a la pérdida de una señal consenso de corte y empalme), el dominio variable (V_{HH}) va inmediatamente seguido por la región bisagra, los dominios C_{H2} y C_{H3} (Nguyen et al., *Mol. Immunol.* 36:515-524 (1999); Woolven et al., *Immunogenetics* 50:98-101 (1999)). El V_{HH} de camélido según se informa se recombina con regiones constantes de IgG2 y de 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 cual el V_H se recombina con una región constante que contiene dominios bisagra, CH1, CH2 y CH3, mientras que la IgG2 y la IgG3 de llama son isotipos sólo de cadena pesada que carecen de dominios CH1 y no contienen cadenas ligeras.

A pesar de que los HCAbs están desprovistos de cadenas ligeras, tienen un repertorio de unión al antígeno. El mecanismo de generación genética de HCAbs se estudia en Nguyen et al. *Adv. Immunol* 79:261-296 (2001) y en Nguyen et al., *Immunogenetics* 53:39-47 (2002). Los tiburones, incluyendo el tiburón nodriza, presentan dominios V similares monoméricos, únicos, con contenido de receptores del antígeno. Irving et al., *J. Immunol. Methods* 248:31-45 (2001); Roux et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:11804 (1998).

Los V_{HHS} comprenden pequeños fragmentos intactos de unión al antígeno (por ejemplo fragmentos que son aproximadamente de 118 a 136 residuos, de 15 kDa). Se ha descubierto que los dominios V_{HH} de camélido se unen al antígeno con alta afinidad (Desmyter et al., *J Biol. Chem.* 276:26285- 90, 2001), con afinidades de V_{HH} que son típicamente de orden nanomolar y comparables a las de los fragmentos Fab y scFv. Los V_{HHS} son altamente solubles y más estables que los correspondientes derivados de fragmentos scFv y Fab. Los fragmentos V_H han venido siendo relativamente difíciles de producir en forma soluble, pero pueden obtenerse mejoramientos de la solubilidad y de la unión específica cuando los residuos de entramado se alteran para resultar más de tipo V_{HH}. Véase, por ejemplo, Reichmann et al., *J Immunol Methods* 1999, 231:25-38). Los V_{HHS} llevan sustituciones de aminoácidos que los hacen más hidrófilos e impiden una interacción prolongada con la BiP (proteína de unión a la cadena pesada de la inmunoglobulina), que normalmente se une a la cadena pesada en el Retículo Endoplásmico (ER) durante el plegamiento y ensamblaje, hasta ser desplazada por la cadena ligera. Debido al incremento de hidrofiliidad de los V_{HHS}, se ve mejorada la secreción desde el ER.

Pueden obtenerse V_{HHS} funcionales mediante escisión proteolítica de HCAb de un camélido inmunizado, mediante clonación directa de genes V_{HH} desde células B de un camélido inmunizado dando como resultado V_{HHS} recombinantes, o a partir de bibliotecas vírgenes (*naïve*) o sintéticas. Pueden también obtenerse V_{HHS} con la especificidad antigénica deseada mediante una metodología de presentación de fagos. El uso de V_{HHS} en presentación de fagos es mucho más sencillo y más eficiente en comparación con los Fabs o con los scFvs, puesto que solamente tiene que clonarse y expresarse un dominio para obtener un fragmento funcional de unión al antígeno. Muyldermans, *Biotechnol.* 74:277-302 (2001); Ghahroudi et al., *FEBS Lett* 414:521-526 (1997); y van der Linden et al., *J. Biotechnol.* 80:261-270 (2000). También se describen métodos para generar anticuerpos que tienen cadenas pesadas de camélido en las Publicaciones de Patente U.S. Núms. 200500136049 y 20050037421.

Pueden usarse métodos de presentación de ribosomas para identificar y aislar moléculas de scFv y/o V_{HH} que tengan la actividad y afinidad de unión deseadas. Irving et al., *J. Immunol. Methods* 248:31-45 (2001). La presentación y selección de ribosomas tiene el potencial de generar y presentar grandes bibliotecas (10¹⁴).

Otras realizaciones aportan moléculas tipo V_{HH} generadas por medio del proceso de camelización, a base de modificar V_Hs que no son de *Camelidae*, tales como V_{HHS} humanos, para mejorar su solubilidad e impedir la unión no específica. Esto se logra sustituyendo residuos en el lado V_Ls de los V_Hs por residuos tipo V_{HH}, imitando con ello a los fragmentos V_{HH} más solubles. Los fragmentos V_H camelizados, en particular los basados en el entramado humano, se prevé que presenten una respuesta inmune notablemente reducida cuando se administran in vivo a un paciente, y en consecuencia se prevé que tengan ventajas importantes 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).

Hay disponible una amplia variedad de sistemas de expresión para la producción de fragmentos de IL-1 β , incluyendo fragmentos Fab, scFv y V_{HHS}. Por ejemplo, pueden usarse sistemas de expresión de origen tanto procariótico como eucariótico para la producción a gran escala de fragmentos de anticuerpos y proteínas de fusión de anticuerpos. Son particularmente ventajosos los sistemas de expresión que permiten la secreción de grandes cantidades de fragmentos de anticuerpo al medio de cultivo.

La producción de Fab-scFv biespecíficos ("bicuerpos") y Fab-(scFv)₂ trispecíficos ("tricuerpos") está descrita 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 bicuerpos o tricuerpos, se fusiona una molécula scFv con una o ambas de las cadenas VL- CL (L) y VH- CH₁ (Fd), p. ej., para producir un tricuerpo se fusionan dos scFvs con el C-terminal de Fab, mientras que en un bicuerpo se fusiona un scFv con el C-terminal de Fab. En Olafsen et al., *Protein Eng Des Sel.* 2004 abr.; 17 (4) : 315- 23 se ha descrito un "minicuerpo" que está compuesto por scFv fusionado con CH3 por medio de un enlazador peptídico (sin bisagra) o por medio de una bisagra de IgG.

Los intracuerpos son anticuerpos de cadena única que manifiestan expresión intracelular y pueden manipular la función proteínica 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 mantienen al constructo de anticuerpo en regiones intracelulares, pueden ser producidos 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 a células en los cuales un dominio de transducción de proteínas (PTD) está fusionado con anticuerpos de fragmento variable de cadena única (scFv) Heng et al., (*Med Hypotheses*, 64:1105-8, 2005).

Los anticuerpos y fragmentos de la presente invención de unión a la IL-1 β también abarcan anticuerpos que son SMIPs o proteínas de fusión de inmunoglobulina con dominio de unión específicas de la proteína diana. Estos constructos son polipéptidos de cadena única que comprenden dominios de unión al antígeno fusionados con dominios de inmunoglobulina necesarios para realizar funciones efectoras de anticuerpo. Véanse, p. ej., el documento WO03/041600, la Publicación de Patente U.S. 20030133939 y la Publicación de Patente U.S. 20030118592.

Los anticuerpos y fragmentos de la presente invención de unión a la IL-1 β también abarcan inmuno adhesinas. Una o más CDRs pueden incorporarse a una molécula de manera o bien covalente o bien no covalente para convertirla en una inmuno adhesina. Una inmuno adhesina puede incorporar la(s) CDR(s) como parte de una cadena polipeptídica mayor, puede enlazar covalentemente la(s) CDR(s) a otra cadena polipeptídica, o puede incorporar la(s) CDR(s) no covalentemente. Las CDRs que aquí se dan a conocer permiten que la inmuno adhesina se una específicamente a la IL-1 β .

Los anticuerpos y fragmentos de la presente invención de unión a la IL-1 β también abarcan miméticos de anticuerpos que comprenden una o más partes de unión a la IL-1 β construidas sobre un andamio orgánico o molecular (tal como un andamio de proteína o carbohidrato). Pueden usarse como reactivos para el diseño de miméticos de anticuerpos, proteínas que tienen estructuras tridimensionales relativamente definidas, a las que comúnmente se denomina andamios de proteína. Estos andamios típicamente contienen una o más regiones que se prestan a variación de secuencia específica o aleatoria, y dicha aleatorización de secuencia se lleva a cabo a menudo para producir bibliotecas de proteínas de las cuales pueden seleccionarse productos deseados. Por ejemplo, un mimético de anticuerpo puede comprender un polipéptido quimérico de unión a una no inmunoglobulina, que tenga un dominio tipo inmunoglobulina que contenga un andamio con dos o más bucles expuestos al solvente y que contengan una CDR diferente de un anticuerpo progenitor insertado en cada uno de los bucles y que presenten actividad de unión selectiva hacia un ligando al que se ha unido el anticuerpo progenitor. Han sido propuestos andamios de proteína no inmunoglobulina para obtener proteínas con propiedades de unión novedosas. (Tramontano et al., *J. Mol. Recognit.* 7:9, 1994; McConnell y Hoess, *J. Mol. Biol.* 250:460, 1995). Se han probado otras proteínas como andamios y las mismas se han usado para presentar residuos aleatorizados en superficies helicoidales 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. EE.UU.* 92:6552, 1995), y bucles constreñidos por puentes disulfuro, tales como los de los inhibidores de proteasa pequeños (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). Se dan a conocer métodos para utilizar andamios para miméticos de anticuerpos en la Patente US 5.770.380 y en las Publicaciones de patente US 2004/0171116, 2004/0266993 y 2005/0038229.

Así, puede generarse una variedad de anticuerpos y fragmentos de unión a la IL-1 β que comprendan una, dos y/o tres CDRs de una región variable de cadena pesada de ID SEC N°: 8, 12, 13, 14, 15, 23, 24, 25 o 26 o una región variable de cadena ligera de ID SEC N°: 9, 10 u 11.

Los anticuerpos o fragmentos preferidos de la presente invención se unen a la IL-1 β con (i) una IC₅₀ de aproximadamente 0,5nM o menos (p. ej. de aproximadamente 0,4 ó menos, aproximadamente 0,3 ó menos, o incluso aproximadamente 0,2 ó menos), según determinación efectuada por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), (ii) una afinidad al menos aproximadamente 100 veces (p. ej. al menos aproximadamente 150 veces, al menos

aproximadamente 200 veces, o incluso al menos aproximadamente 250 veces) mayor con respecto a su unión de la IL-1 α (es decir tiene una selectividad para IL-1 β con respecto a la IL-1 α de al menos aproximadamente 100 veces (p. ej. de al menos aproximadamente 150 veces, de al menos aproximadamente 200 veces, o incluso de al menos aproximadamente 250 veces)), y/o (iii) una constante de disociación de la unión en equilibrio (K_D) para IL-1 β de aproximadamente 20pM o menos (p. ej. de aproximadamente 15pM o menos, de aproximadamente 10pM o menos, o incluso de aproximadamente 5pM o menos). También se prefieren anticuerpos o fragmentos de la invención que pueden inhibir la expresión de IL-6 sérica inducida por IL-1 β en un animal en al menos un 50% (p. ej. en al menos un 60%, en al menos un 70%, o incluso en al menos un 80%) en comparación con el nivel de IL-6 sérica en un animal estimulado con IL-1 β al que no le ha sido administrado un anticuerpo o fragmento de la invención. En consecuencia, la invención aporta, en un aspecto afín, un anticuerpo que se une a la IL-1 β o un fragmento de anticuerpo que se une a la IL-1 β y que tiene al menos una de las características anteriormente mencionadas.

A pesar de que la invención ha sido aquí descrita con respecto a anticuerpos y fragmentos de los mismos de unión a la IL-1 β (p. ej. que comprenden una cadena ligera y pesada), la invención también describe polipéptidos que no son anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de unión a la IL-1 β , tales como polipéptidos de cadena única (incluyendo polipéptidos de fusión, polipéptidos quiméricos, conjugados y similares). Así, en el contexto de la invención se describe un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las ID SEC N°: 8, 12, 13, 14, 15, 23, 24, 25, 26, o 9, 10, 11 o un fragmento o una variante del mismo funcionalmente equivalente.

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que aquí se describen pueden ser preparados por cualquier método adecuado. Son conocidos en la técnica métodos adecuados para preparar dichos anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. Otros métodos para preparar los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos son tal como se describen en la presente como parte de la invención. El anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o polipéptido de la invención, como aquí se describe, puede ser aislado o purificado en cualquier grado. En el sentido que aquí se le da, un compuesto aislado es un compuesto que ha sido separado de su entorno natural. Un compuesto purificado es un compuesto cuya pureza ha sido incrementada, de forma tal que el compuesto existe en una forma que es más pura que aquella en la que existe (i) en su entorno natural o (ii) cuando se sintetiza y/o amplifica inicialmente bajo condiciones de laboratorio, siendo "pureza" un término relativo que no significa necesariamente "pureza absoluta".

Cualesquiera de los anteriores anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o polipéptidos de la invención pueden ser humanizados o modificados por ingeniería para humanos, según se describe en la presente.

Métodos de preparación de anticuerpos o fragmentos para IL-1 β

En el contexto de la invención se describe un método de preparación de un polipéptido madurado por afinidad que se une a la IL-1 β , tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (incluyendo una región de anticuerpo (p. ej. una región variable de cadena ligera o pesada o cualquier parte de la misma, tal como una CDR)), comprendiendo dicho método (a) proporcionar un primer ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de unión a la IL-1 β que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las ID SEC N°: 1 a 26 y un segundo ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que se diferencia de la primera secuencia de ácido nucleico en al menos un nucleótido, (b) llevar a cabo un reordenamiento de ácidos nucleicos para proporcionar dos o más ácidos nucleicos mutados, y (c) seleccionar un ácido nucleico mutado que codifique un polipéptido que (i) se una a la IL-1 β con una afinidad mayor que la del polipéptido codificado por el primer ácido nucleico, (ii) tenga una selectividad para IL-1 β con respecto a la IL-1 α que sea mayor que la del polipéptido codificado por el primer ácido nucleico, (iii) tenga una constante de disociación de la unión en equilibrio (K_D) para IL-1 β que sea menor que la del polipéptido codificado por el primer ácido nucleico, o (iv) inhiba la expresión, inducida por IL-1 β , de IL-6 sérica en un animal en mayor grado que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico, y (d) expresar el ácido nucleico mutado seleccionado para proporcionar un polipéptido madurado por afinidad para la IL-1 β . Preferiblemente, el polipéptido es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, tal como cualquier anticuerpo o fragmento de anticuerpo de los que aquí se describen como parte de la invención.

El método de preparación de un polipéptido madurado por afinidad para IL-1 β comprende además de manera opcional repetir los pasos (b) y (c) una o más veces, en donde el reordenamiento de ácidos nucleicos del paso (b) se lleva a cabo usando (i) al menos un ácido nucleico mutado seleccionado del paso (c) y (ii) al menos un ácido nucleico que tenga una secuencia de ácido nucleico que se diferencie del ácido nucleico mutado seleccionado en al menos un nucleótido. Preferiblemente se repiten los pasos (b) y (c) hasta haber sido seleccionado un ácido nucleico optimizado. Un ácido nucleico optimizado se selecciona cuando ya no es posible seleccionar un ácido nucleico que codifique un polipéptido que tenga características de unión con respecto a la IL-1 β (p. ej. las características (i) a (iv) del paso (c)) que sean superiores a las de un polipéptido codificado por un ácido nucleico anteriormente seleccionado.

Según lo deseable, se repiten los pasos (b) y (c) hasta haber sido seleccionado un ácido nucleico que codifique un polipéptido que tenga al menos una de las propiedades siguientes: (i) que se una a la IL-1 β con una IC_{50} de aproximadamente 0,5nM o menos (p. ej. de aproximadamente 0,4 ó menos, de aproximadamente 0,3 ó menos, o incluso de aproximadamente 0,2 ó menos), según determinación efectuada por ensayo inmunoabsorbente ligado a

enzimas (ELISA), (ii) que se una a la IL-1 β con una afinidad al menos aproximadamente 100 veces (p. ej. al menos aproximadamente 150 veces, al menos aproximadamente 200 veces, o incluso al menos aproximadamente 250 veces) mayor con respecto a su unión de la IL-1 α (es decir, que tenga una selectividad para IL-1 β con respecto a la IL-1 α de al menos aproximadamente 100 veces (p. ej. de al menos aproximadamente 150 veces, al menos aproximadamente 200 veces, o incluso de al menos aproximadamente 250 veces)), (iii) que se una a la IL-1 β con una constante de disociación de la unión en equilibrio (K_D) para la IL-1 β de aproximadamente 20pM o menos (p. ej. de aproximadamente 15pM o menos, de aproximadamente 10pM o menos, 5pM o menos, 3pM o menos, 2pM o menos, 1pM o menos, 0,7pM o menos, 0,5pM o menos, 0,3pM o menos, o 0,2pM o menos), o (iv) que inhiba la expresión, inducida por IL-1 β , de IL-6 sérica en un animal en al menos un 50% (p. ej. en al menos un 60%, en al menos un 70%, o incluso en al menos un 80%) en comparación con el nivel de IL-6 sérica en un animal estimulado con IL-1 β al que no se le haya administrado un anticuerpo o fragmento de la invención.

La selección de un ácido nucleico mutado que codifique un polipéptido que tenga las propiedades deseadas puede ser llevada a cabo por cualquier método adecuado. Se dan a conocer aquí (véanse los Ejemplos) procedimientos para expresar polipéptidos codificados y someter a ensayo los polipéptidos con respecto a la afinidad de unión, la selectividad de unión, las constantes de unión en equilibrio y la inhibición de la expresión, inducida por IL-1 β , de IL-6. Son conocidos en la técnica otros métodos adecuados. Cuando el polipéptido codificado por el ácido nucleico mutado que se obtiene en el paso (b) no sea un anticuerpo o fragmento de anticuerpo completo (p. ej. Fab), puede ser necesario proporcionar un anticuerpo que comprenda el polipéptido con el fin de determinar si el polipéptido satisface los criterios de selección. Así, el método de preparación de un polipéptido madurado por afinidad para IL-1 β puede comprender adicionalmente un paso de proporcionar un anticuerpo que comprenda el polipéptido codificado por el ácido nucleico mutado, donde el paso de seleccionar el ácido nucleico mutado que codifique un polipéptido que tenga las propiedades deseadas es llevado a cabo sometiendo al anticuerpo a ensayo.

En el sentido en el que se utiliza en la presente, reordenamiento de ácidos nucleicos significa fragmentar dos o más secuencias de ácido nucleico para obtener una combinación de fragmentos aleatorios de ácido nucleico y reensamblar los fragmentos para crear dos o más ácidos nucleicos mutados. A este respecto, un ácido nucleico mutado es meramente un ácido nucleico que tiene una secuencia de ácido nucleico que ha sido modificada. El reordenamiento de ácidos nucleicos puede ser llevada a cabo por cualquier método adecuado. Son conocidos en la técnica muchos métodos adecuados, tales como los que se describen en las Patentes U.S. 6.489.145; 6.773.900; 6.764.835; 6.740.506; 6.713.282; 6.713.281; 6.713.279; 6.709.841; 6.696.275; 6.677.115; 6.673.552; 6.656.677; 6.605.449; 6.566.050; 6.562.594; 6.555.315; 6.537.776; 6.528.249; 6.479.258; 6.455.254; 6.440.668; 6.368.798; 6.361.974; 6.358.709; 6.352.842; 6.344.328; 6.335.179; 6.280.926; 6.238.884; 6.174.673; 6.171.820; 6.168.919; 6.057.103; 6.054.267; 6.030.779 6.001.574; 5.965.408; 5.958.672; 5.939.250; 5.763.239; 6.395.547; 6.376.246; 6.372.497; 6.368.861; 6.365.408; 6.365.377; 6.358.740; 6.358.742; 6.355.484; 6.344.356; 6.337.186; 6.335.160; 6.323.030; 6.319.714; 6.319.713; 6.303.344; 6.297.053; 6.291.242; 6.287.861; 6.277.638; 6.180.406; 6.165.793; 6.132.970; 6.117.679; 5.834.252; 5.830.721; 5.811.238; 5.605.793.

Ácidos Nucleicos

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención pueden ser codificados por un único ácido nucleico (p. ej. un único ácido nucleico que comprenda secuencias de nucleótidos que codifiquen los polipéptidos de cadena ligera y pesada del anticuerpo), o por dos o más ácidos nucleicos independientes que codifiquen cada uno de ellos una parte distinta del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. A este respecto, la invención aporta uno o más ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los anteriores anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o polipéptidos (p. ej. cualquiera de las anteriores regiones variables de cadena ligera o pesada).

Según un aspecto de la invención, la invención aporta un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo o de una parte del mismo. Se aportan ejemplos de secuencias de ácido nucleico en las ID SEC N°: 39 y 40, que respectivamente codifican la región variable de cadena pesada de ID SEC N°: 15 y la región variable de cadena ligera de ID SEC N°: 11. A este respecto, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica un polipéptido (p. ej. una región variable de cadena pesada de un anticuerpo) que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 12 o de ID SEC N°: 13, (p. ej. un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las ID SEC N°: 14 a 15), o que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 23 ó de ID SEC N°: 24, (p. ej. ID SEC N°: 25 ó ID SEC N°: 26).

Como alternativa o adicionalmente, el ácido nucleico de la invención puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo o de una parte del mismo. A este respecto, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica un polipéptido (p. ej. una región variable de cadena ligera) que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 1. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede codificar un polipéptido que comprenda la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 9. Más preferiblemente, el ácido nucleico codifica un polipéptido (p. ej. una región variable de cadena ligera) que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 10 u 11.

La invención también abarca ácidos nucleicos que codifican cualesquiera de las anteriores secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras o pesadas que comprenden una o más sustituciones conservadoras (p. ej. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 sustituciones conservadoras), como se ha expuesto con respecto al anticuerpo y al fragmento de anticuerpo de la invención, donde el anticuerpo o fragmento que comprende la sustitución tiene la misma o sustancialmente la misma afinidad y especificidad de unión al epítipo que uno o más de los ejemplos de anticuerpos, fragmentos y secuencias que aquí se dan a conocer.

Las secuencias de ácido nucleico pueden determinarse a partir de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y regiones variables de cadena ligera o pesada que aquí se describen por cualquier método adecuado, tal como convirtiendo dichas secuencias de aminoácidos en las correspondientes secuencias de ácido nucleico usando el código genético. Los ácidos nucleicos que codifican esas secuencias de aminoácidos (tales como las secuencias de aminoácidos que aquí se describen) pueden ser preparados (p. ej. las secuencias de ácido nucleico pueden ser aisladas o sintetizadas) usando métodos de los que son conocidos en la técnica, tales como los que se describen, por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 3ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1994; y Herdewijn, ed., *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications (Methods in Molecular Biology)*, Humana Press, Totowa, NJ, 2004. Los ácidos nucleicos que aquí se describen pueden ser aislados o purificados en cualquier grado. En el sentido que se le da en la presente, un compuesto aislado es un compuesto que ha sido separado de su entorno natural. Un compuesto purificado es un compuesto cuya pureza ha sido incrementada, de forma tal que el compuesto existe en una forma que es más pura que aquella en la que existe (i) en su entorno natural o (ii) cuando se sintetiza y/o amplifica inicialmente bajo condiciones de laboratorio, en donde "pureza" es un término relativo y no significa necesariamente "pureza absoluta".

Los ácidos nucleicos pueden ser purificados usando cualquiera de una variedad de técnicas entre las que se incluyen, aunque sin carácter limitativo, la electroforesis en gel preparativa o el electroisoelectroforesis, la cromatografía de afinidad, de inmunoafinidad o de intercambio iónico, la cromatografía de tamices moleculares, el cromatoforforesis o la cromatografía líquida de alta presión.

Vectores

Los ácidos nucleicos que aquí se describen pueden ser insertados en vectores, p. ej. vectores de expresión de ácido nucleico y/o vectores de direccionamiento. Dichos vectores se pueden usar de varias maneras, p. ej. para la expresión de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a la IL-1 β en una célula o en un animal transgénico. En consecuencia, la invención aporta un vector que comprende uno cualquiera o más de los ácidos nucleicos de la invención. Un "vector" es toda molécula o composición que tenga la capacidad de llevar una secuencia de ácido nucleico al interior de una célula huésped adecuada donde pueda tener lugar la síntesis del polipéptido codificado. Típicamente y con preferencia, un vector es un ácido nucleico que ha sido modificado por ingeniería, usando técnicas de ADN recombinante que son conocidas en el ramo, para incorporar una secuencia deseada de ácido nucleico (p. ej. un ácido nucleico de la invención). Según lo deseable, el vector consta de ADN. Los ejemplos de vectores adecuados de transferencia génica basados en ADN incluyen plásmidos y vectores virales. Los vectores virales adecuados incluyen, por ejemplo, vectores basados en parvovirus (p. ej. vectores basados en virus adenoasociados (AAV)), vectores retrovirales, vectores basados en virus herpes simplex (HSV), vectores quiméricos adenovirales-AAV, vectores basados en virus HIV y vectores basados en adenovirus. Cualesquiera de estos vectores pueden ser preparados usando técnicas de ADN recombinante convencionales que se describen, p. ej., en Sambrook et al., *supra* y en Ausubel et al., *supra*. Sin embargo son también conocidos en la técnica y se pueden usar en relación con la invención vectores que no están basados en ácidos nucleicos, tales como liposomas. El vector de la invención se puede basar en un único tipo de ácido nucleico (p. ej. un plásmido) o molécula que no sea ácido nucleico (p. ej. un lípido o un polímero). Como alternativa, el vector puede ser una combinación de un ácido nucleico y un ácido no nucleico (es decir, un vector "quimérico"). Por ejemplo, un plásmido que albergue al ácido nucleico se puede formular con un lípido o un polímero como vehículo de aporte. A un vector de este tipo se le denomina aquí "complejo plásmido-lípido" y complejo "plásmido-polímero", respectivamente. El vector de transferencia génica de la invención puede estar integrado en el genoma de la célula huésped o puede estar presente en la célula huésped en forma de un episoma.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser insertados en vectores de expresión de inmunoglobulina, por ejemplo los vectores que se describen en McLean et al., *Mol. Immunol.*, 37: 837-45 (2000); Walls et al., *Nucleic Acids Res.*, 21: 2921-9 (1993); y Norderhaug et al., *J. Immunol. Meth.*, 204: 77-87 (1997).

Los vectores son típicamente seleccionados para que sean funcionales en la célula huésped en la cual se usará el vector (el vector será compatible con la maquinaria de la célula huésped de forma tal que pueda producirse una amplificación del gen y/o la expresión del gen). Una molécula de ácido nucleico que codifique un anticuerpo o fragmento que se une a la IL-1 β puede ser amplificada/expresada en células huésped procarióticas, de levadura, de insecto (sistemas de baculovirus) y/o eucarióticas. La selección de la célula huésped dependerá en parte de si el anticuerpo o fragmento que se une a la IL-1 β debe ser modificado post-transicionalmente (p. ej. glicosilado y/o fosforilado). En caso afirmativo, son preferibles las células huésped de levadura, de insecto o de mamífero. Puede encontrarse información

adicional acerca de vectores de expresión en Meth. Enz. v. 185 (1990; Goeddel, ed.), Academic Press Inc., San Diego, Calif.

- 5 Los vectores de expresión típicamente contienen uno o más de los componentes siguientes: un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación transcripcional, una secuencia intrón completa que contenga un sitio de corte y empalme de dador y aceptor, una secuencia líder para la secreción, un sitio de unión al ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región polienlazadora para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido a expresar, y un elemento marcador seleccionable.
- 10 Los componentes vector pueden ser homólogos (de la misma especie y/o cepa que la célula huésped), heterólogos (de una especie distinta de la especie o cepa de la célula huésped), híbridos (una combinación de secuencias distintas de más de una fuente), sintéticos, o secuencias nativas que normalmente funcionen regulando la expresión de inmunoglobulina. Las fuentes de componentes vector pueden ser cualquier organismo procariótico o eucariótico, cualquier organismo vertebrado o invertebrado, o cualquier vegetal, siempre que los componentes sean funcionales en y
- 15 puedan ser activados por la maquinaria de la célula huésped.
- Un origen de replicación se selecciona sobre la base del tipo de célula huésped que se use para la expresión. A título de ejemplo, el origen de replicación del plásmido pBR322 (Producto N° 303-3s, *New England Biolabs*, Beverly, Mass.) es útil para la mayoría de las bacterias gram-negativas, mientras que varios orígenes de SV40, poliovirus, adenovirus, virus de la estomatitis vesicular (VSV) o papillomavirus (tales como HPV o BPV) son útiles para clonar vectores en células de mamífero. Generalmente no se necesita el componente origen de replicación para vectores de expresión en mamíferos (por ejemplo, el origen de SV40 se usa a menudo porque contiene el promotor inicial).
- 20 Una secuencia de terminación de la transcripción está típicamente situada en la posición 3' del extremo de un polipéptido que codifica regiones y sirve para terminar la transcripción. Las secuencias de terminación de la transcripción en células procarióticas a menudo comprenden un fragmento rico en G-C seguido por una secuencia poli T. Las secuencias de terminación de la transcripción pueden ser clonadas a partir de una biblioteca, pueden ser adquiridas comercialmente como parte de un vector, o pueden ser sintetizadas usando métodos para la síntesis de ácidos nucleicos tales como los anteriormente descritos.
- 25 Un elemento de gen marcador seleccionable codifica una proteína necesaria para la supervivencia y el crecimiento de una célula huésped cultivada en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, p. ej. la ampicilina, la tetraciclina o la canamicina para células huésped procarióticas, (b) complementan deficiencias auxotrópicas de la célula; o (c) aportan nutrientes críticos no disponibles a partir de medios complejos. Son marcadores seleccionables preferidos el gen de resistencia a la canamicina, el gen de resistencia a la ampicilina y el gen de resistencia a la tetraciclina. Puede también usarse un gen de resistencia a la neomicina para la selección en células huésped procarióticas y eucarióticas.
- 30 Pueden usarse otros genes de selección para amplificar el gen que se expresará. La amplificación es un proceso en el que los genes de los que hay mayor demanda para la producción de una proteína crítica para el crecimiento son reiterados en tándem dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Los ejemplos de marcadores seleccionables para células de mamífero incluyen dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidina quinasa. Los transformantes de células de mamífero son puestos bajo una presión de selección a la que solamente los transformantes están singularmente adaptados para sobrevivir en virtud del marcador que está presente en el vector. La presión de selección se impone cultivando las células transformadas bajo condiciones en las cuales la concentración de agente de selección en el medio varía sucesivamente, conduciendo con ello a la amplificación tanto del gen de selección como del ADN que codifica un anticuerpo o fragmento para IL-1 β . Como resultado, a partir del ADN amplificado se sintetizan cantidades incrementadas de un anticuerpo.
- 35 Generalmente hay presente un sitio de unión a ribosomas para iniciar la traducción de ARNm. Por ejemplo, un sitio de este tipo está caracterizado por una secuencia Shine-Dalgarno (procariotas) o una secuencia Kozak (eucariotas). El elemento está típicamente situado en la posición 3' con respecto al promotor y en la posición 5' con respecto a la secuencia codificadora del polipéptido a expresar. La secuencia Shine-Dalgarno es variada pero es típicamente una polipurina (que tiene un alto contenido de A-G). Han sido identificadas muchas secuencias Shine-Dalgarno, pudiéndose sintetizar una de ellas sintetizada fácilmente usando los métodos que se han expuesto anteriormente y pudiéndose usar en un vector procariótico.
- 40 Puede usarse una secuencia líder, o señal, para dirigir la secreción de un polipéptido. Una secuencia señal puede estar posicionada dentro o directamente en el extremo 5' de una región codificadora del polipéptido. Muchas secuencias señal han sido identificadas y pueden ser seleccionadas sobre la base de la célula huésped usada para la expresión. Una secuencia señal puede ser homóloga (que se da de manera natural) o heteróloga para una secuencia de ácido nucleico que codifique la proteína a expresar (tal como un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno). Una secuencia señal heteróloga seleccionada deberá ser una que sea reconocida y procesada (escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para células huésped procarióticas que no reconozcan ni procesen una secuencia señal de anticuerpo
- 45
- 50
- 55
- 60

nativo, la secuencia señal es sustituida por una secuencia señal procariótica seleccionada, por ejemplo, del grupo de los líderes de fosfatasa alcalina, penicilinasas o enterotoxina II termoestable. Para la secreción de levadura, una secuencia señal de anticuerpo nativo puede ser sustituida por los líderes de invertasa de levadura, factor alfa o ácido fosfatasa. En expresión en células de mamífero es generalmente satisfactoria la secuencia señal nativa, si bien pueden ser adecuadas otras secuencias señal de mamífero.

En la mayoría de los casos, la secreción de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno desde una célula huésped dará como resultado la eliminación del péptido señal del anticuerpo o fragmento. Así, el anticuerpo o fragmento maduro carecerá de toda secuencia líder o señal.

En algunos casos, tal como cuando se desee glicosilación en un sistema de expresión de una célula huésped eucariótica, pueden manipularse las distintas presecuencias para mejorar la glicosilación o rendimiento. Por ejemplo, puede alterarse el sitio de escisión para la peptidasa de un péptido señal, o pueden añadirse presecuencias, lo cual también puede afectar la glicosilación. El anticuerpo o fragmento final puede tener en la posición -1 (con respecto al primer aminoácido de la proteína madura) uno o más aminoácidos adicionales que incidan en la expresión y que pueden no haber sido totalmente eliminados. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento final puede tener uno o dos aminoácidos que se encuentren en el sitio de escisión para la peptidasa, unidos al N-terminal. Como alternativa, el uso de algunos sitios de escisión enzimática puede dar como resultado una forma ligeramente truncada del anticuerpo o fragmento deseado, si la enzima efectúa el corte en una zona de este tipo dentro del anticuerpo o fragmento maduro.

Los vectores de expresión típicamente contendrán un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está operativamente enlazado a una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo que se une a la IL-1 β o fragmento que se une al antígeno. Puede usarse un promotor o bien nativo o bien heterólogo, en función de la célula huésped que se use para la expresión y del rendimiento deseado.

Los promotores destinados a ser usados con huéspedes procarióticos incluyen los sistemas promotores de beta-lactamasa y lactosa; fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (trp); y promotores híbridos tales como el promotor tac. Son también adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Sus secuencias han sido publicadas, y los mismos pueden estar ligados a una(s) secuencia(s) de ácido nucleico deseada(s), usando enlazadores o adaptadores que sean deseables para proporcionar sitios de restricción.

Son también conocidos en la técnica promotores destinados a ser usados con huéspedes de levadura. Se usan ventajosamente potenciadores de levadura con promotores de levadura. Son bien conocidos promotores que son adecuados para ser usados con células huésped de mamífero, y los mismos incluyen los obtenidos de los genomas de virus tales como poliomavirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como el Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y con la máxima preferencia el Virus de Simio 40 (SV40). Otros promotores adecuados de mamífero incluyen promotores heterólogos de mamífero, p. ej. promotores de shock térmico y el promotor de actina.

Los promotores adicionales que se pueden usar para expresar los agentes de unión selectiva de la invención incluyen, aunque sin carácter limitativo: la región promotora inicial de SV40 (Bemoist y Chambon, *Nature*, 290:304-310, 1981); el promotor CMV; el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma del Rous (Yamamoto et al. (1980), *Cell* 22: 787-97); el promotor de timidina quinasa del herpes (Wagner et al. (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 1444-5); las secuencias reguladoras del gen de metalotionina (Brinster et al., *Nature*, 296: 39-42, 1982); vectores de expresión procariótica tales como el promotor de beta-lactamasa (Villa-Kamaroff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75: 3727-3731, 1978); o el promotor tac (DeBoer et al. (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80: 21-5). También son de interés las siguientes regiones de control transcripcional animal que presentan especificidad tisular y han sido utilizadas en animales transgénicos: la región de control del gen de elastasa I que es activa en células acinares pancreáticas (Swift et al. (1984), *Cell* 38: 639-46; Omitz et al. (1986), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50: 399-409; MacDonald (1984), *Hepatology* 7: 425-515); la región de control del gen de insulina que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan (1985), *Nature* 315: 115-22); la región de control del gen de inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl et al. (1984), *Cell* 38: 647-58; Adames et al. (1985), *Nature* 318: 533-8; Alexander et al. (1987), *Mol. Cell. Biol.* 7: 1436-44); la región de control del virus del tumor mamario de ratón que es activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder et al. (1986), *Cell* 45: 485-95), la región de control del gen de albúmina que es activa en el hígado (Pinkert et al. (1987), *Genes and Devel.* 1: 268-76); la región de control del gen de alfafetoproteína que es activa en el hígado (Krumlauf et al. (1985), *Mol. Cell. Biol.* 5: 1639-48; Hammer et al. (1987), *Science*, 235: 53-8); la región de control del gen de alfa 1-antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey et al. (1987), *Genes and Devel.* 1: 161-71), la región de control del gen de beta-globina que es activa en células mieloides (Mogram et al., *Nature*, 315 338-340, 1985; Kollias et al. (1986), *Cell* 46: 89-94); la región de control del gen de la proteína básica mielina, que es activa en células oligodendrocíticas en el cerebro (Readhead et al. (1987), *Cell*, 48: 703-12); la región de control del gen de la cadena ligera 2 de miosina, que es activa en el músculo esquelético (Sani (1985), *Nature*, 314: 283-6); y la región de control del gen de la hormona de liberación gonadotrófica, que es activa en el hipotálamo (Mason et al. (1986), *Science* 234: 1372-8).

Puede insertarse una secuencia potenciadora en el vector para incrementar la transcripción en células huésped eucarióticas. Son conocidas varias secuencias potenciadoras que pueden ser obtenidas de genes de mamífero (p. ej. globina, elastasa, albúmina, alfa-feto-proteína e insulina). Sin embargo, típicamente se usará un potenciador de un virus. El potenciador de SV40, el potenciador del promotor inicial de citomegalovirus, el potenciador de polioma y potenciadores de adenovirus son ejemplos de elementos potenciadores para la activación de promotores eucarióticos.

Aunque un potenciador se puede empalmar en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a la región codificadora del polipéptido, el mismo está típicamente situado en un sitio 5' con respecto al promotor.

Los vectores para expresar ácidos nucleicos incluyen aquellos que son compatibles con células huésped bacterianas, de insecto y de mamífero. Dichos vectores incluyen, inter alia, pCRII, pCR3 y pcDNA3.1 (Invitrogen Company, San Diego, Calif.), pBSII (Stratagene Company, La Jolla, Calif.), pET15 (Novagen, Madison, Wis.), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, Calif.), pETL (BlueBacII; Invitrogen), pDSR-alfa (Publicación PCT N° WO90/14363) y pFastBacDual (Gibco/BRL, Gran Island, N.Y.).

Los posibles vectores adicionales incluyen, aunque sin carácter limitativo, cósmidos, plásmidos o virus modificados, pero el sistema vector debe ser compatible con la célula huésped seleccionada. Dichos vectores incluyen, aunque sin carácter limitativo, plásmidos tales como derivados de plásmido Bluescript® (un fagémido basado en ColE1 con alto número de copias, Stratagene Cloning Systems Inc., La Jolla Calif.), plásmidos de clonación para PCR diseñados para clonar productos de PCR amplificados con Taq (p. ej. TOPO™. TA Cloning® Kit, derivados de plásmido PCR:1, Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores de mamífero, levadura o virus tales como un sistema de expresión de baculovirus (derivados de plásmido pBacPAK, Clontech, Palo Alto, Calif.). Las moléculas recombinantes pueden ser introducidas en células huésped mediante técnicas de transformación, transfección, infección, electroporación u otras técnicas conocidas.

Células huésped y usos de las mismas

La invención adicionalmente aporta una célula (p. ej. una célula aislada o purificada) que comprende un ácido nucleico o vector de la invención. La célula puede ser cualquier tipo de célula, (con la excepción de una célula ovárica fertilizada humana o una célula troncal embrionaria humana), capaz de ser transformada con el ácido nucleico o vector de la invención para producir un polipéptido codificado por el mismo. La célula es preferiblemente la célula de un mamífero, tal como un humano, y es más preferiblemente una célula de hibridoma, una célula troncal embrionaria o un óvulo fertilizado.

Para expresar el anticuerpo o fragmento que se une a la IL-1 β , ADNs que codifican cadenas ligeras y pesadas de longitud parcial o completa, obtenidos como se ha descrito anteriormente, son insertados en vectores de expresión de forma tal que los genes queden operativamente enlazados a secuencias de control transcripcional y traduccional. En este contexto, la expresión "operativamente enlazado" tiene el significado de que un gen de anticuerpo se liga a un vector de forma tal que las secuencias de control transcripcional y traduccional dentro del vector sirven para desempeñar su función pretendida de regular la transcripción y traducción del gen de anticuerpo. Las secuencias de vector de expresión y de control de expresión se eligen para que sean compatibles con la célula huésped de expresión que se use. El gen de cadena ligera de anticuerpo y el gen de cadena pesada de anticuerpo se pueden insertar en vectores independientes, o más típicamente ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo son insertados en el vector de expresión mediante métodos convencionales (p. ej. la ligación de sitios de restricción complementarios en el vector y fragmento de gen de anticuerpo, o la ligación de extremos romos si no hay presentes sitios de restricción). Antes de la inserción de las secuencias de cadena ligera o pesada, el vector de expresión puede ya llevar secuencias de región constante de anticuerpo. Por ejemplo, un planteamiento para convertir las secuencias VH y VL seleccionadas en genes de anticuerpo de longitud completa es el de insertarlas en vectores de expresión que ya codifiquen regiones constantes de cadena pesada y regiones constantes de cadena ligera, respectivamente, de forma tal que el segmento VH quede enlazado operativamente al segmento o a los segmentos CH dentro del vector y que el segmento VL quede enlazado operativamente al segmento CL dentro del vector. Adicionalmente o como alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilite la secreción de la cadena de anticuerpo desde una célula huésped. El gen de la cadena de anticuerpo se puede clonar en el vector de forma tal que el péptido señal quede enlazado en marco al terminal amino del gen de la cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden llevar secuencias reguladoras que controlen la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula huésped. En la expresión secuencia reguladora se pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (p. ej. señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras están descritas, por ejemplo, en Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Se apreciará que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la

célula huésped a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, así como otras consideraciones. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión en células huésped de mamífero incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero.

- 5 Además de los genes de cadena de anticuerpo y de las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulen la replicación del vector en células huésped (p. ej. orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las cuales ha sido introducido el vector (véanse, p. ej., las Patentes U.S. N° 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel et al.). Por ejemplo, típicamente el gen marcador
- 10 seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la cual ha sido introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped dhfr con amplificación/selección de metotrexato) y el gen neo (para selección para G418).
- 15 Los métodos para introducir ácidos nucleicos y vectores en células aisladas y el cultivo y la selección de células huésped transformadas *in vitro* son conocidos en la técnica e incluyen el uso de transformación mediada por cloruro cálcico, transducción, conjugación, apareamiento triparental, DEAE, transfección mediada por dextrano, infección, fusión de membranas con liposomas, bombardeo de alta velocidad con microproyectiles recubiertos con ADN, microinyección directa en células individuales y electroporación (véanse, p. ej., Sambrook et al., supra; Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, 2ª ed., McGraw-Hill Professional, 1995; y Neumann et al., EMBO J., 1: 841 (1982)).
- 20

La célula que comprende el ácido nucleico o vector de la invención puede ser usada para producir el anticuerpo, o fragmento del mismo, que se une a la IL-1 β , o una parte del mismo (p. ej. una secuencia de cadena pesada, o una secuencia de cadena ligera codificada por el ácido nucleico o vector). Tras haber introducido el ácido nucleico o vector

25 de la invención en la célula, la célula es cultivada bajo condiciones adecuadas para la expresión de la secuencia codificada. El anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la parte del anticuerpo se puede aislar a continuación con respecto a la célula.

En ciertas realizaciones se pueden introducir en la célula dos o más vectores que juntamente codifiquen un anticuerpo que se une a la IL-1 β o un fragmento del mismo que se una al antígeno. Por ejemplo, se puede introducir en una célula huésped un primer vector que codifique una región variable de cadena pesada o una secuencia de cadena pesada completa, y también se introduce en la célula huésped un segundo vector que codifique una región variable de cadena ligera o una secuencia de cadena ligera completa. La célula a continuación se cultiva bajo condiciones adecuadas para la expresión de las dos secuencias codificadas por los vectores primero y segundo, y los polipéptidos codificados

30 pueden ser aislados de la célula huésped. De ser necesario, los polipéptidos aislados pueden combinarse a continuación bajo condiciones que promuevan su asociación y organización para constituir un anticuerpo que se una a la IL-1 β o un fragmento del mismo que se una al antígeno. Como alternativa, los vectores primero y segundo pueden ser introducidos en células independientes, y los productos pueden ser aislados de las respectivas células y combinados para obtener un anticuerpo que se una a la IL-1 β o un fragmento del mismo que se una al antígeno. En la técnica se han descrito métodos para promover la asociación y organización de constituyentes de anticuerpos para formar polipéptidos de unión a antígenos. Análogamente son conocidos para los profesionales con conocimientos habituales métodos para aislar un anticuerpo, un fragmento del mismo de unión al antígeno, o fragmentos de cadena pesada y de cadena ligera.

35

Para generar un animal no humano transgénico pueden usarse células troncales embrionarias u óvulos fertilizados (con la excepción de las células troncales embrionarias humanas o los óvulos fertilizados humanos) que comprendan un ácido nucleico o vector de la invención. Métodos para materializar animales transgénicos están descritos en Hofker et al., *Transgenic Mouse: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Humana Press, Clifton, NJ, 2002. Los animales no humanos transgénicos que comprendan un ácido nucleico o vector de los que aquí se dan a conocer se

40 pueden usar para expresar el anticuerpo codificado, el fragmento de unión al antígeno o la parte del anticuerpo. El anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la parte pueden aislarse a continuación del animal. Partes de un anticuerpo pueden posteriormente reconstituirse (en combinación con partes adicionales del anticuerpo) para obtener un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención que se una a la IL-1 β .

45

Las células huésped pueden ser células huésped procarióticas (tales como *E. coli*) o células huésped eucarióticas (tales como una célula de levadura, una célula de insecto o una célula de vertebrado). La célula huésped, cuando se cultiva bajo condiciones apropiadas, expresa un anticuerpo o fragmento que se une a la IL-1 β , que puede posteriormente ser recogido del medio de cultivo (si la célula huésped lo secreta al medio) o directamente de la célula huésped que lo produce (si el mismo no es secretado). La selección de una célula huésped apropiada dependerá de varios factores, tales como los niveles de expresión deseados, las modificaciones polipeptídicas que sean deseables o necesarias para la actividad, tal como la glicosilación o la fosforilación, y la facilidad de plegamiento para formar una molécula biológicamente activa. En la técnica se conoce una serie de células huésped adecuadas y muchas pueden ser

50

55

60

obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Manassas, Va. Los ejemplos incluyen células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino (CHO) (N° CCL61 de la ATCC), células CHO DHFR (Urlaub et

- al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4216-4220 (1980)), células renales embrionarias humanas (HEK) 293 ó 293T (N° CRL1573 de la ATCC), células 3T3 (N° CCL92 de la ATCC) o células PER.C6. Son conocidos en la técnica la selección de células huésped adecuadas de mamífero y métodos de transformación, cultivo, amplificación, cribaje y producción y purificación de productos. Otras líneas celulares adecuadas de mamífero son las líneas celulares COS-1 (N° CRL1650 de la ATCC) y COS-7 (N° CRL1651 de la ATCC) de mono, y la línea celular CV-1 (N° CCL70 de la ATCC). Otros ejemplos de células huésped de mamífero incluyen líneas celulares de primate, líneas celulares aviares y líneas celulares de roedor, incluyendo líneas celulares transformadas. Son también adecuadas células diploides normales, cepas celulares derivadas de cultivo in vitro de tejido primario así como explantes primarios. Las células candidatas pueden ser genotípicamente deficientes en el gen de selección, o pueden contener un gen de selección de acción dominante. Otras líneas celulares adecuadas de mamífero incluyen, aunque sin carácter limitativo, células N2A de neuroblastoma de ratón, células L-929 de ratón, HeLa, líneas 3T3 derivadas de ratones suizos, Balb-c o NIH, líneas celulares de hámster HaK o BHK, que pueden ser obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, Va. Cada una de estas líneas celulares es conocida por y está a disposición de aquellos expertos en la técnica de la expresión de proteínas.
- Son análogamente útiles como células huésped adecuadas para la presente invención las células bacterianas. Por ejemplo, las distintas cepas de *E. coli* (p. ej. HB101 (N° 33694 de la ATCC), DH5 α , DH10 y MC1061 (N° 53338 de la ATCC)) son bien conocidas como células huésped en el campo de la biotecnología. Pueden también utilizarse en este método varias cepas de *B. subtilis*, *Pseudomonas* spp., otros *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. y similares.
- Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, el (los) vector(es) de expresión que codifica(n) las cadenas pesadas y ligeras es (son) transfectado(s) en una célula huésped mediante técnicas convencionales. La transfección abarca una amplia variedad de técnicas que se usan comúnmente para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariótica o eucariótica, p. ej. la electroporación, la precipitación de fosfato cálcico, la transfección con DEAE-dextrano y similares. A pesar de que es teóricamente posible expresar los anticuerpos o fragmentos de unión a la IL-1 β en células huésped procarióticas o eucarióticas, la expresión de los anticuerpos o fragmentos en células eucarióticas, y con la máxima preferencia en células huésped de mamífero, es la más preferida porque dichas células eucarióticas, y en particular las células de mamífero, es más probable que ensamblen y secreten un anticuerpo correctamente plegado e inmunológicamente activo en comparación con las células procarióticas. Las células huésped de mamífero para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen Ovario de Hámster Chino (células CHO) (incluyendo células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, usadas con un marcador seleccionable de DHFR, p. ej. como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando vectores de expresión recombinante que codifican genes de anticuerpo se introducen en células huésped de mamífero, los anticuerpos son producidos cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped, o más preferiblemente, la secreción del anticuerpo al medio de cultivo en el cual se cultivan las células huésped. Los anticuerpos pueden ser recuperados a partir del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas convencionales.
- Muchas cepas de células de levadura que son conocidas en la técnica están también disponibles como células huésped para la expresión de los anticuerpos y fragmentos. Las células de levadura preferidas incluyen, por ejemplo, las *Saccharomyces cerevisiae*. Adicionalmente, cuando se desee pueden utilizarse sistemas celulares de insectos. Dichos sistemas están descritos por ejemplo en Kitts et al. (*Biotechniques*, 14, 810-817 (1993)), Lucklow (*Curr. Opin. Biotechnol.*, 4, 564-572 (1993) y Lucklow et al. (*J. Virol.*, 67, 4566-4579 (1993)). Son células de insecto preferidas las Sf-9 y Hi5 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.).
- La transformación o transfección de una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento que se une a la IL-1 β en una célula huésped seleccionada puede ser llevada a cabo por métodos bien conocidos entre los que se incluyen los métodos que hacen uso de cloruro cálcico, los métodos de electroporación, los métodos de microinyección, los métodos de lipofección o los métodos que utilizan DEAE-dextrano. El método que se seleccione dependerá en parte del tipo de célula huésped a usar. Estos métodos y otros métodos adecuados son bien conocidos y se exponen, por ejemplo, en Sambrook et al. supra.
- Pueden también usarse animales transgénicos para expresar anticuerpos y fragmentos glicosilados. Por ejemplo, puede usarse un animal transgénico productor de leche (una vaca o una cabra, por ejemplo) y pueden obtenerse agentes de unión glicosilados en la leche animal. Como alternativa, pueden usarse vegetales para producir agentes de unión selectiva glicosilados.
- Células huésped que comprendan un vector de expresión que codifique un anticuerpo o fragmento que se una a la IL-1 β pueden ser cultivadas usando medios conocidos en la técnica. Los medios habitualmente contendrán todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y la supervivencia de las células. Los ejemplos de medios para cultivar células *E. coli* incluyen el Caldo Luria (LB) y/o el Caldo Terrific (TB). Son medios adecuados para cultivar células eucarióticas los RPMI 1640, MEM y DMEM, los cuales se pueden complementar con suero y/o factores de crecimiento según se desee para la línea celular particular que se cultive. Un ejemplo de medio para cultivos de células de insecto es el medio

de Grace suplementado con yeastolato, hidrolizado de lactalbúmina y/o suero bovino fetal, según sea necesario.

Se puede añadir como suplemento a los medios un antibiótico u otro compuesto que sea útil para el crecimiento selectivo de células transfectadas o transformadas. El compuesto será elegido sobre la base del elemento marcador seleccionable presente en el plásmido con el cual fue transformada la célula huésped. Por ejemplo, cuando el elemento marcador seleccionable es la resistencia a la canamicina, el compuesto que se añadirá al medio de cultivo será canamicina. Otros compuestos para crecimiento selectivo incluyen la ampicilina, la tetraciclina y la neomicina.

La cantidad de anticuerpo o fragmento que se une a la IL-1 β producido por una célula huésped puede ser evaluada usando métodos conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen, sin carácter limitativo, el análisis Western blot, la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, la electroforesis en gel no desnaturizante, la separación por HPLC, la inmunoprecipitación y/o los ensayos de actividad.

La purificación de un anticuerpo o fragmento de unión a la IL-1 β que ha sido secretado a los medios celulares puede llevarse a cabo usando una variedad de técnicas entre las que se incluyen la cromatografía de afinidad, de inmunoafinidad o de intercambio iónico, la cromatografía de tamices moleculares, la electroforesis en gel preparativa o el electroisoelefoque, el cromatoelefoque y la cromatografía líquida de alta presión. Por ejemplo, los anticuerpos que comprenden una región Fc pueden ser purificados por cromatografía de afinidad con Proteína A, que se une selectivamente a la región Fc. Formas modificadas de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se pueden preparar con etiquetas de afinidad, tales como hexahistidina u otro pequeño péptido tal como FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, Conn.) o myc (Invitrogen) en su terminal o bien carboxilo o bien amino, y se pueden purificar mediante una columna de afinidad de un solo paso. Por ejemplo, la polihistidina se une con gran afinidad y especificidad al níquel, y por consiguiente puede usarse una columna de afinidad de níquel (tal como las columnas de níquel Qiagen®) para la purificación de agentes de unión selectiva etiquetados con polihistidina. (Véase, por ejemplo, Ausubel et al. eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Sección 10.11.8, John Wiley & Sons, Nueva York (1993)). En algunos casos puede utilizarse más de un paso de purificación.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a la IL-1 β que se expresan en células huésped procarióticas pueden estar presentes en forma soluble ya sea en el espacio periplásmico o bien en el citoplasma o en forma insoluble como parte de cuerpos de inclusión intracelular. Los anticuerpos o fragmentos de unión a la IL-1 β pueden ser extraídos de la célula huésped usando cualquier técnica apropiada de las que son conocidas en el ramo. Por ejemplo, las células huésped pueden ser lisadas para liberar el contenido del periplasma/citoplasma mediante prensa de French, homogeneización y/o sonicación seguida por centrifugación.

Las formas solubles de un anticuerpo o fragmento de unión a la IL-1 β , o bien presente en el citoplasma o bien liberado desde el espacio periplásmico, se pueden purificar adicionalmente usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo la liberación de fragmentos Fab desde el espacio periplásmico bacteriano mediante técnicas de choque osmótico.

Si se han formado cuerpos de inclusión que comprenden un anticuerpo o fragmento, los mismos pueden a menudo unirse a las membranas celulares interiores y/o exteriores y por consiguiente se encontrarán primariamente en el material pelletizado tras centrifugación. El material pelletizado se puede tratar a continuación en los extremos del pH o con agente caotrópico tal como un detergente, guanidina, derivados de guanidina, urea o derivados de urea en presencia de un agente reductor tal como ditiotretol a pH alcalino o tris-carboxietil-fosfina a pH ácido para liberar, disgregar y solubilizar los cuerpos de inclusión. El anticuerpo o fragmento soluble se puede analizar a continuación usando electroforesis en gel, inmunoprecipitación o técnicas similares. Si se desea aislar un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, solubilizado, el aislamiento puede ser llevado a cabo usando métodos convencionales tales como los que se exponen a continuación y en Marston et al. (*Meth. Enz.*, 182:264-275 (1990)).

En algunos casos, un anticuerpo o fragmento que se une a la IL-1 β puede no ser biológicamente activo tras el aislamiento. Para restablecer la actividad biológica pueden usarse varios métodos para "replegar" o convertir un polipéptido a su estructura terciaria y generar enlaces disulfuro. Dichos métodos incluyen el de exponer el polipéptido solubilizado a un pH de habitualmente más de 7 y en presencia de una determinada concentración de un caotropo. La selección de caotropo es muy similar a las elecciones que se usan para la solubilización de cuerpos de inclusión, pero habitualmente el caotropo se usa a una concentración menor y no es necesariamente igual a los caotropos que se usan para la solubilización. En la mayoría de los casos la solución de replegamiento/oxidación también contendrá un agente reductor o el agente reductor más su forma oxidada en una proporción específica para generar un determinado potencial de redox que permita que se produzca un reordenamiento de disulfuros en la formación del (de los) puente(s) de cisteína de la proteína. Algunas de las parejas redox que se usan comúnmente incluyen cisteína/cistamina, glutatona (GSH)/ditiobis GSH, cloruro cúprico, ditiotretol (DTT)/ditiatio DTT y 2-mercaptoetanol (bME)/di-tio- b (ME). En muchos casos puede usarse un cosolvente para incrementar la eficiencia del replegamiento, y los reactivos comunes que se usan con esta finalidad incluyen glicerina, polietilenglicol de varios pesos moleculares, arginina y similares.

Los anticuerpos o fragmentos de la presente invención de unión a la IL-1 β pueden también ser preparados por métodos

de síntesis química (tales como la síntesis de péptidos en fase sólida) usando técnicas conocidas en el ramo tales como las expuestas por Merrifield et al. (1963), *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149, Houghten et al. (1985), *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 82: 5132, y Stewart and Young (1984), *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Cl., Rockford, Ill. Dichos anticuerpos o fragmentos pueden ser sintetizados con o sin una metionina en el terminal amino. Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno sintetizados químicamente pueden ser oxidados usando métodos que se exponen en estas referencias para formar puentes disulfuro. Los anticuerpos y fragmentos así preparados conservarán al menos una actividad biológica asociada a un anticuerpo o fragmento de unión a la IL-1 β nativo o producido de manera recombinante.

10 Composiciones farmacéuticas

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, ácidos nucleicos o vectores de la invención de unión a la IL-1 β se pueden formular en composiciones, especialmente composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención de unión a la IL-1 β en mezcla con un vehículo adecuado, p. ej. un agente farmacéuticamente aceptable. Típicamente, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, ácidos nucleicos o vectores de la invención de unión a la IL-1 β se purifican suficientemente para su administración a un animal antes de su formulación en una composición farmacéutica.

Los agentes farmacéuticamente aceptables destinados a ser usados en las composiciones farmacéuticas incluyen vehículos, excipientes, diluyentes, antioxidantes, conservantes, colorantes, agentes saborizantes y diluyentes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, solventes, cargas, agentes voluminizantes, tampones, vehículos de aporte, agentes de tonicidad, cosolventes, agentes humectantes, agentes complejantes, agentes tamponantes, antimicrobianos y surfactantes.

Son ejemplos de vehículos apropiados la solución salina tamponada neutra o la solución salina mezclada con albúmina sérica. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos 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 de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o surfactantes no iónicos tales como Tween, plurónicos o polietilenglicol (PEG). También a modo de ejemplo, los agentes potenciadores de la tonicidad adecuados incluyen halogenuros metálicos (preferiblemente cloruro sódico o potásico), manitol, sorbitol y similares. Los conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio, timerosal, fenetilalcohol, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico y similares. También puede usarse como conservante peróxido de hidrógeno. Los cosolventes adecuados incluyen glicerina, propilenglicol y PEG. Los agentes complejantes adecuados incluyen cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina. Los surfactantes o agentes humectantes adecuados incluyen ésteres de sorbitano, polisorbato tales como polisorbato 80, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal y similares. Los tampones pueden ser tampones convencionales tales como acetato, borato, citrato, fosfato, bicarbonato o Tris-HCl. El tampón de acetato puede ser aproximadamente de pH 4-5,5, y el tampón de Tris puede ser aproximadamente de pH 7-8,5. Se exponen agentes farmacéuticos adicionales en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª Edición, A. R. Gennaro, redactor en jefe, Pack 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, surfactantes, aditivos estructurales de alto peso molecular y/o agentes voluminizantes (véanse 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 que en general se incluye es tal que, tras la reconstitución, la formulación resultante será isotónica, si bien también pueden ser adecuadas formulaciones hipertónicas o ligeramente hipotónicas. Adicionalmente, la cantidad de lioprotector deberá ser suficiente para impedir una cantidad inaceptable de degradación y/o agregación de la proteína tras liofilización. Los ejemplos de las concentraciones de lioprotector para azúcares (p. ej. sacarosa, lactosa y trehalosa) en la formulación prelioofilizada son de aproximadamente 10mM a aproximadamente 400mM. En otra realización se incluye un surfactante tal como, por ejemplo, surfactantes no iónicos y surfactantes iónicos tales como polisorbato (p. ej. polisorbato 20, polisorbato 80); poloxámeros (p. ej. el poloxámero 188); poli(etilenglicol)feniléteres (p. ej. Triton); dodecilsulfato sódico (SDS); laurilsulfato sódico; octilglicósido sódico; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sulfobetaina; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sarcosina; linoleil-, miristil- o cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil- o isoestearamidopropil-betaína (p. ej. lauroamidopropil); miristamidopropil-, palmidopropil- o isoestearamidopropil-dimetilamina; metilcooil-taurato sódico o metiloleil-taurato disódico; y la serie MONAQUATTM (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.), polietilglicol, polipropilglicol y copolímeros de etilenglicol y propilenglicol (p. ej. Pluronic, PF68, etc.). Los ejemplos de las cantidades de surfactante que pueden estar presentes en la formulación prelioofilizada son de aproximadamente entre un 0,001 y un 0,5%. Los aditivos estructurales de alto peso molecular (p. ej. Cargas, aglutinantes) pueden incluir, por ejemplo, acacia, albúmina, ácido alginico, fosfato cálcico (dibásico), celulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa microcristalina, dextrano, dextrina, dextratos, sacarosa, tilosa, almidón pregelatinizado, sulfato cálcico, amilosa,

glicina, bentonita, maltosa, sorbitol, etilcelulosa, hidrogenofosfato de disodio, fosfato disódico, piro sulfito disódico, polivinilalcohol, gelatina, glucosa, goma guar, glucosa líquida, azúcar compresible, silicato de aluminio y magnesio, maltodextrina, óxido de polietileno, polimetacrilatos, povidona, alginato sódico, tragacanto, celulosa microcristalina, almidón y ceína. Los ejemplos de las concentraciones de aditivos estructurales de alto peso molecular son de un 0,1% a un 10% en peso. En otras realizaciones puede incluirse un agente voluminizante (p. ej. Manitol, glicina).

Las composiciones pueden ser adecuadas para administración parenteral. Los ejemplos de composiciones son adecuados para inyección o infusión a un animal por cualquier vía disponible para el profesional especializado, tales como las vías intraarticular, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial o intralesional. Una formulación parenteral típicamente será una solución acuosa isotónica estéril y exenta de pirógenos, que opcionalmente contendrá conservantes farmacéuticamente aceptables.

Son ejemplos de solventes no acuosos propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo la solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer lactato, o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen restablecedores de fluidos y nutrientes, restablecedores de electrolitos tales como los basados en dextrosa de Ringer, y similares. Pueden también estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares. Véase en general la publicación *Remington's Pharmaceutical Science*, 16ª Ed., Mack Eds., 1980, que se incorpora aquí por referencia.

Las composiciones farmacéuticas que aquí se describen se pueden formular para aporte controlado o sostenido de una manera que proporcione una concentración local del producto (p. ej. bolo o efecto de depósito (*depot*)) y/o una estabilidad o vida media incrementada en un determinado entorno local. Las composiciones pueden incluir la formulación de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, ácidos nucleicos o vectores de la invención de unión a la IL-1 β con preparaciones particuladas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc., así como agentes tales como una matriz biodegradable, microesferas inyectables, partículas microcapsulares, microcápsulas, perlas de partículas bioerosionables, liposomas y dispositivos de aporte implantables que proporcionen la liberación controlada o sostenida del agente activo, que a continuación se puede aportar en forma de inyección de depósito (*depot*). Las técnicas para formular tales medios de aporte sostenido o controlado son conocidas, y una variedad de polímeros se ha desarrollado y usado para la liberación y el aporte controlados de fármacos. Tales polímeros son típicamente biodegradables y biocompatibles. Hidrogeles de polímero, incluyendo los formados por complejación de segmentos de polímeros o polipéptidos enantioméricos, e hidrogeles con propiedades de sensibilidad a la temperatura o al pH pueden ser deseables para proporcionar un efecto de depósito (*depot*) de fármaco debido a las condiciones suaves y acuosas que intervienen en el atrapamiento de agentes proteínicos bioactivos (p. ej. anticuerpos). Véase, por ejemplo, la descripción de micropartículas poliméricas porosas de liberación controlada para el aporte de composiciones farmacéuticas en la Publicación de Solicitud PCT WO 93/15722.

Los materiales adecuados para esta finalidad incluyen polilactidas (véase, p. ej., 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-hidroxietilmetacrilato) (Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167-277 (1981) y Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982)), vinilacetato de etileno, 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 ser preparados por cualesquiera de varios métodos que son conocidos en la técnica (véase, p. ej., Eppstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688-92 (1985)). El propio vehículo, o sus productos de degradación deberá(n) ser atóxico(s) en el tejido diana y no deberá(n) agravar adicionalmente la condición. Esto puede determinarse mediante cribado rutinario en modelos animales del trastorno diana, o, si tales modelos no están disponibles, en animales normales.

La microencapsulación de proteínas recombinantes para liberación sostenida ha sido llevada a cabo con éxito con hormona del crecimiento humana (rhGH), interferón-(rhIFN-), interleuquina-2 y MN rgp 120. 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 and Newman, redactores en jefe (Plenum Press: Nueva York, 1995), págs. 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 fueron desarrolladas usando polímero de ácido poli-láctico-coglicólico (PLGA) debido a su biocompatibilidad y a su amplia gama de propiedades de biodegradación. Los productos de degradación de los ácidos PLGA, láctico y glicólico pueden ser eliminados rápidamente dentro del cuerpo humano. Además, la degradabilidad de este polímero puede estar en función de su composición y peso molecular. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer," en: M. Chasin y R. Langer (Redactores en jefe.), *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (Marcel Dekker: Nueva York, 1990), págs. 1-41. Los ejemplos adicionales de

composiciones de liberación sostenida incluyen, por ejemplo, el documento EP 58.481A, la Pat. U.S. Nº 3.887.699, el documento EP 158.277A, la 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].

Se contemplan también polímeros bioadhesivos para ser usados en o con composiciones de la presente invención. Los bioadhesivos son materiales sintéticos y que se dan de manera natural que son capaces de adherirse a sustratos biológicos durante periodos de tiempo prolongados. Por ejemplo, el Carbopol y el Policarbofil son ambos derivados reticulados sintéticos de poli(ácido acrílico). Los sistemas de aporte bioadhesivos basados en sustancias que se dan de manera natural incluyen, por ejemplo, ácido hialurónico, que es también conocido como hialuronano. El ácido hialurónico es un mucopolisacárido que se da de manera natural, compuesto por residuos de D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina. El ácido hialurónico se encuentra en la matriz tisular extracelular de los vertebrados, e inclusive en tejidos conectivos, así como en el fluido sinovial y en el humor vítreo y acuoso del ojo. Se han usado derivados esterificados de ácido hialurónico para producir microesferas para su uso en administración de sustancias que son biocompatibles y biodegradables (véanse, por ejemplo, Cortivo et al., *Biomaterials* (1991) 12: 727-730; la Publicación Europea Nº 517.565, la Publicación Internacional Nº WO 96/29998; Illum et al., *J. Controlled Rel.* (1994) 29: 133-141). Los ejemplos de composiciones de la presente invención que contienen ácido hialurónico comprenden un polímero de éster de ácido hialurónico en una cantidad de aproximadamente un 0,1% a aproximadamente un 40% (peso/peso) de un anticuerpo o fragmento de unión a IL-1 β referido a polímero de ácido hialurónico.

Pueden usarse para administrar composiciones de la presente invención matrices poliméricas tanto biodegradables como no biodegradables, y tales matrices poliméricas pueden comprender polímeros naturales o sintéticos. Se prefieren las matrices biodegradables. El periodo de tiempo por espacio del cual se produce la liberación está basado en la selección del polímero. Típicamente la más deseable es una liberación a lo largo de un periodo de entre unas pocas horas y tres a doce meses. Los ejemplos de polímeros sintéticos que se pueden usar para formar el sistema de administración biodegradable incluyen: polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, polialquilenglicoles, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, alcoholes polivinílicos, éteres polivinílicos, ésteres polivinílicos, halogenuros polivinílicos, polivinilpirrolidona, poliglicólidos, polisiloxanos, polianhidridos, poliuretanos y copolímeros de los mismos, poli(ácido bórico), poli(ácido valérico), alquilcelulosa, hidroxialquilcelulosas, ésteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitrocelulosas, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato butirato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, carboxietilcelulosa, triacetato de celulosa, sal sódica de sulfato de celulosa, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), poli(acrilato de octadecilo), polietileno, polipropileno, poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno), poli(tereftalato de etileno), poli(alcoholes vinílicos), acetato de polivinilo, cloruro de polivinilo, poliestireno y polivinilpirrolidona. Los ejemplos de polímeros naturales incluyen alginato y otros polisacáridos incluyendo dextrano y celulosa, colágeno, derivados químicos de los mismos (sustituciones, adiciones de grupos químicos, por ejemplo alquilo, alquileo, hidroxilaciones, oxidaciones y otras modificaciones de las que son hechas rutinariamente por los expertos en la materia), albúmina y otras proteínas hidrófilas, ceína y otras prolaminas y proteínas hidrófobas, y copolímeros y mezclas de los mismos. En general, estos materiales se degradan ya sea por hidrólisis enzimática o bien por exposición a agua in vivo, por erosión superficial o en masa. El polímero opcionalmente está en forma de un hidrogel (véanse, por ejemplo, la WO 04/009664, la WO 05/087201 y Sawhney et al., *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587) que puede absorber hasta aproximadamente un 90% de su peso en agua y además está opcionalmente reticulado con iones multivalentes u otros polímeros.

Los sistemas de administración también incluyen sistemas no poliméricos que son lípidos, incluyendo esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono-, di- y tri-glicéridos; sistemas de liberación en forma de hidrogel; sistemas silastic; sistemas basados en péptidos; recubrimientos de cera; comprimidos obtenidos por compresión que usan aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, aunque sin carácter limitativo: (a) sistemas erosivos en los cuales el producto está contenido en una forma dentro de una matriz tal como los que se describen en las Pat. U.S. Núms. 4.452.775, 4.675.189 y 5.736.152, y (b) sistemas difusivos en los cuales un producto permea a una velocidad controlada desde un polímero tal como se describe en las Pat. U.S. Núms. 3.854.480, 5.133.974 y 5.407.686. Los liposomas que contienen el producto pueden ser preparados 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. Núms. 4.485.045 y 4.544.545; y EP 102.324).

Como alternativa o adicionalmente, las composiciones pueden ser administradas localmente mediante implantación en la zona afectada, de una membrana, una esponja u otro material apropiado en el cual haya sido absorbido o encapsulado un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención que se une a la IL-1 β . Cuando se use un dispositivo de implantación, el dispositivo puede ser implantado en cualquier tejido u órgano

adecuado, y la administración de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención que se une a la IL-1 β puede ser directamente a través del dispositivo mediante bolo o mediante administración continua o mediante catéter usando infusión continua.

5 Una composición farmacéutica que comprenda un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención que se une a la IL-1 β puede formularse para inhalación, tal como por ejemplo en forma de un polvo seco. Pueden también formularse soluciones para inhalación en un propelente licuado para administración como aerosol. Todavía en otra formulación, las soluciones pueden ser nebulizadas. Composiciones farmacéuticas adicionales para administración pulmonar incluyen las descritas, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud PCT WO 94/20069, que da a
10 conocer la administración pulmonar de proteínas modificadas químicamente. Para administración pulmonar, el tamaño de las partículas deberá ser adecuado para la administración al pulmón distal. Por ejemplo, el tamaño de las partículas puede ser de 1 μ m a 5 μ m; si bien pueden usarse partículas de mayor tamaño, por ejemplo si cada partícula es bastante porosa.

15 Ciertas formulaciones que contienen anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, ácidos nucleicos o vectores de la invención de unión a la IL-1 β pueden ser administradas oralmente. Las formulaciones administradas de esta manera se pueden formular con o sin los vehículos que son habitualmente usados para la composición de formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas. Por ejemplo, una cápsula puede ser diseñada para liberar la parte activa de la formulación en el punto del tracto gastrointestinal en el que se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la
20 degradación presistémica. Pueden incluirse agentes adicionales para facilitar la absorción de un agente de unión selectiva. También pueden utilizarse diluyentes, saborizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes de desintegración de comprimidos y aglutinantes.

Otra preparación puede conllevar una cantidad eficaz de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención de unión a la IL-1 β en una mezcla con excipientes atóxicos que sean adecuados para la fabricación de comprimidos. Disolviendo los comprimidos en agua estéril o en otro vehículo apropiado, pueden prepararse soluciones en forma de dosis unitaria. Los excipientes adecuados incluyen, aunque sin carácter limitativo, diluyentes inertes, tales como carbonato cálcico, carbonato o bicarbonato sódico, lactosa, o fosfato cálcico; o agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o acacia; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido
25 esteárico, o talco.

Las formulaciones farmacéuticas adecuadas y/o preferidas pueden determinarse en vista de la presente exposición y de los conocimientos generales en la tecnología de las formulaciones, en función de la vía de administración prevista, del formato de administración y de la dosificación deseada. Independientemente de la forma de administración, una dosis eficaz puede calcularse según el peso corporal, el área superficial del cuerpo o el tamaño del órgano del paciente. Las mejoras adicionales de precisión de los cálculos para determinar la dosificación apropiada para el tratamiento que
35 conllevan cada una de las formulaciones que aquí se describen se efectúan rutinariamente en la técnica. Las dosificaciones apropiadas se pueden averiguar mediante el uso de datos apropiados de dosis-respuesta.

Formulaciones adicionales resultarán evidentes a la luz de la presente exposición, incluyendo formulaciones que implican anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, ácidos nucleicos o vectores de la invención de unión a la IL-1 β en combinación con otro u otros agentes terapéuticos. Por ejemplo, en algunas formulaciones se formula un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención de unión a la IL-1 β , con un segundo inhibidor de una
45 ruta de señalización de IL-1. Los segundos inhibidores representativos incluyen, aunque sin carácter limitativo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, péptidos, polipéptidos, compuestos, ácidos nucleicos, vectores y composiciones farmacéuticas, tales como por ejemplo los que se describen en las patentes US 6899878, US 2003022869, US 200660094663, US 20050186615, US 20030166069, WO/04022718, WO/05084696 y WO/05019259. Por ejemplo, una composición puede comprender un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención que se
50 une a la IL-1 β en combinación con un anticuerpo, fragmento de unión a IL-1 β , o un ácido nucleico o vector que codifique dicho anticuerpo o fragmento.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender anticuerpos o fragmentos que se unan a la IL-1 β en combinación con otros agentes activos. Tales combinaciones son aquellas útiles para su finalidad perseguida. Los agentes activos que se exponen a continuación tienen fines ilustrativos y no pretenden constituir limitaciones. Las combinaciones que
55 son parte de esta invención pueden ser los presentes anticuerpos y fragmentos y al menos un agente adicional seleccionado de entre las posteriores listas. La combinación puede también incluir más de un agente adicional, p. ej. dos o tres agentes adicionales, si la combinación es tal que la composición formada pueda desempeñar su función prevista.

60 Los agentes activos o combinaciones con los presentes anticuerpos o fragmentos incluyen un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID) tal como aspirina, ibuprofeno y otros derivados del ácido propiónico (alminoprofeno, benoxaprofeno, ácido buclóxico, carprofeno, fenbufeno, fenoprofeno, fluprofeno, flurbiprofeno, indoprofeno, ketoprofeno, mioprofeno, naproxeno, oxaprocina, piroprofeno, pranoprofeno, suprofeno, ácido tiaprofénico y tiioxaprofeno), derivados

de ácido acético (indometacina, acemetacina, alclofenaco, clidanaco, diclofenaco, fenclofenaco, ácido fenclórico, fentiazaco, furofenaco, ibufenaco, isoxepaco, oxpinaco, sulindaco, tiopinaco, tolmetina, cidometacina y zomepiraco), derivados de ácido fenámico (ácido flufenámico, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido niflúmico y ácido tolfenámico), derivados de ácido bifenilcarboxílico (diflunisal y flufenisal), oxicams (isoxicam, piroxicam, sudoxicam y tenoxicam), salicilatos (ácido acetilsalicílico, sulfasalacina) y las pirazonas (apazona, bezpiperilona, feprazona, mofebutazona, oxifenbutazona, fenilbutazona). Otras combinaciones incluyen inhibidores de ciclooxigenasa-2 (COX-2). Otros agentes activos para ser usados en combinación incluyen esteroides tales como prednisolona, prednisona, metilprednisolona, betametasona, dexametasona o hidrocortisona. Una combinación de este tipo puede ser especialmente ventajosa, puesto que uno o más efectos secundarios del esteroide pueden ser reducidos o incluso eliminados graduando la dosis de esteroide requerida cuando se tratan pacientes en combinación con los presentes anticuerpos y fragmentos.

Los ejemplos adicionales de agentes activos para combinaciones con anticuerpos o fragmentos de unión a la IL-1 β para la artritis reumatoide incluyen fármaco(s) antiinflamatorio(s) supresor(es) de citoquina (CSAIDs); anticuerpos para o antagonistas de otras citoquinas o factores de crecimiento humanos, por ejemplo TNF, LT, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF o PDGF. Los anticuerpos y fragmentos de unión a la IL-1 β se pueden combinar con anticuerpos para moléculas de superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, o sus ligandos, incluyendo el CD 154 (gp39 ó CD40L).

Las combinaciones preferidas de agentes activos pueden interferir en distintos puntos en la cascada autoinmune y subsiguiente cascada inflamatoria; los ejemplos preferidos incluyen antagonistas TNF como anticuerpos TNF quiméricos, humanizados o humanos, D2E7, cA2 (RemicadeTM), CDP 571, fragmentos de anticuerpo anti-TNF (p. ej. CDP870), y receptores p55 ó p75TNF solubles, derivados de los mismos (p75TNFRlgG (EnbrelTM) o p55TNFRlgG (Lenercept)), receptor IL-13 soluble (sIL-13), y también inhibidores de enzima de conversión de TNF α (TACE); análogamente pueden ser eficaces por la misma razón inhibidores de IL-1 (p. ej. inhibidores de la enzima convertidora de interleuquina-1, tales como Vx740 ó IL-1RA, etc.). Otras combinaciones preferidas incluyen Interleuquina 11, anti-P7s y ligando de glicoproteína p-selectina (PSGL). Aún otra combinación es la que se forma con otros agentes clave de la respuesta autoinmune que pueden actuar paralelamente a la función de IL-1 β o en dependencia o en sintonía con la misma.

Los agentes activos para la enfermedad de Crohn en los cuales puede combinarse un anticuerpo o una parte de unión al antígeno incluyen antagonistas TNF, por ejemplo anticuerpos anti-TNF, D2E7, cA2 (RemicadeTM), CDP 571, fragmentos de anticuerpo anti-TNF (p. ej. CDP870), constructos TNFR-Ig (p75TNFRlgG (EnbrelTM) y p55TNFRlgG (Lenercept)), anti-P7s, ligando glicoproteína p-selectina (PSGL), receptor IL-13 soluble (sIL-13) e inhibidores PDE4. Los anticuerpos o fragmentos de unión a la IL-1 β pueden ser combinados con corticosteroides, por ejemplo budenosida y dexametasona. Los anticuerpos o fragmentos de unión a la IL-1 β pueden también ser combinados con agentes tales como sulfasalacina, ácido 5-aminosalicílico y olsalacina, y con agentes que interfieren en la síntesis o acción de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1, por ejemplo inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 (p. ej. Vx740) e IL-1ra. Los anticuerpos o fragmentos de unión a la IL-1 β pueden también ser usados con inhibidores de la señalización de las células T, por ejemplo inhibidores de tirosina quinasa, 6-mercaptopurinas. Los anticuerpos o fragmentos de unión a la IL-1 β se pueden combinar con IL-11.

Otros ejemplos de agentes activos para esclerosis múltiple con los cuales pueden combinarse los anticuerpos o fragmentos de unión a la IL-1 β incluyen corticosteroides; prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida; ciclosporina; metotrexato; 4-aminopiridina; tizanidina; interferón- β 1a (Avonex; Biogen); interferón- β 1b (Betaseron; Chiron/Berlex); Copolímero 1 (Cop-1; Copaxona; Teve Pharmaceutical Industries, Inc.); oxígeno hiperbárico; inmunoglobulina intravenosa; clabribina; anticuerpos para o antagonistas de otras citoquinas u otros factores de crecimiento humanos, por ejemplo TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF y PDGF. Los anticuerpos o fragmentos de unión a la IL-1 β se pueden combinar con anticuerpos para moléculas de la superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 ó sus ligandos. Los anticuerpos o fragmentos de unión a la IL-1 β pueden ser combinados con agentes tales como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetil, leflunomida, NSAIDs, por ejemplo ibuprofeno, corticosteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización de citoquinas proinflamatorias tales como TNF α o IL-1 (p. ej. inhibidores de IRAK, NIK, IKK, p38 ó quinasa MAP), inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 β (p. ej. Vx740), anti-P7s, ligando glicoproteína p-selectina (PSGL), inhibidores de TACE, inhibidores de la señalización de células T tales como inhibidores de quinasa, inhibidores de metaloproteínasa, sulfasalacina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, receptores de citoquina solubles y derivados de los mismos (p. ej. receptores p55 ó p75 TNF solubles, sIL-1 RI, sIL-1 RII, sIL-6R, receptor IL-13 soluble (sIL-13)) y citoquinas antiinflamatorias (p. ej. IL-4, IL-10, IL-13 y TGF β).

Los ejemplos preferidos de agentes activos para esclerosis múltiple en los cuales los anticuerpos o fragmentos de unión a la IL-1 β se pueden combinar de manera que incluir interferón- β , por ejemplo IFN β 1a e IFN β 1b; copaxona, corticosteroides, inhibidores de IL-1, inhibidores TNF y anticuerpos para ligando CD40 y CD80.

- Las composiciones farmacéuticas pueden incluir una cantidad terapéuticamente eficaz o una cantidad profilácticamente eficaz de los presentes anticuerpos o fragmentos de unión a la IL-1 β . Cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a una cantidad que con las dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios es eficaz para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o de la parte de anticuerpo puede variar según factores tales como el estado de enfermedad, la edad, el sexo, y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o de la parte del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquella con la cual los efectos terapéuticamente beneficiosos superan a cualesquiera efectos tóxicos o perjudiciales del anticuerpo o de la parte del anticuerpo. Cantidad profilácticamente eficaz se refiere a una cantidad que con las dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios es eficaz para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, puesto que una dosis profiláctica se usa en sujetos antes de o en una fase más temprana de enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.
- Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, ácidos nucleicos o vectores de la invención de unión a la IL-1 β pueden ser utilizados en solitario o en combinación con otros agentes activos, que pueden estar en la misma composición farmacéutica o en una composición farmacéutica diferente. Por ejemplo, dichos otros agentes activos pueden comprender (i) un antagonista de IL-1 (p. ej. IL-1Ra recombinante o una trampa de IL), (ii) un antagonista de receptor de interleuquina-1, (iii) un receptor 1 de TNF soluble, (iv) un receptor 2 de TNF soluble (p. ej. etanercept), (v) un inhibidor de TNF (p. ej. un anticuerpo tal como D2E7), y/o (vi) un agente de terapia contra el cáncer. Así por ejemplo, uno o más de estos componentes pueden incluirse en la composición de la invención con un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención que se une a la IL-1 β .
- Puede ser deseable en algunos casos usar una composición farmacéutica que comprenda un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención que se une a la IL-1 β de una manera *ex vivo*. En este caso, células, tejidos u órganos que han sido retirados de un paciente se exponen a composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención que se une a la IL-1 β , después de lo cual las células, los tejidos y/o los órganos son posteriormente reimplantados en el paciente.
- En ciertas situaciones, una composición que comprenda un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de unión a la IL-1 β se puede administrar implantando en pacientes células que hayan sido modificadas por ingeniería genética, como aquí se describe, para expresar y secretar los polipéptidos, agentes de unión selectiva, fragmentos, variantes o derivados. Tales células pueden ser células animales o humanas, y pueden derivarse del propio tejido del paciente o de otra fuente, ya sea humana o no humana. Opcionalmente, las células pueden ser células inmortalizadas. Sin embargo, con el fin de reducir la probabilidad de una respuesta inmunológica, se prefiere que las células estén encapsuladas para evitar la infiltración los tejidos circundantes. Los materiales de encapsulación son típicamente membranas o encerramientos poliméricos semipermeables biocompatibles que permiten la liberación del (de los) producto(s) proteico(s) pero impiden la destrucción de las células por parte del sistema inmune del paciente o por otros factores perjudiciales de los tejidos circundantes.
- Son conocidos métodos que se usan para la encapsulación de células en membranas, y la preparación de células encapsuladas y su implantación en pacientes han sido descritas, por ejemplo, en las Patentes U.S. 4.892.538, 5.011.472 y 5.106.627. En la Publicación de Solicitud PCT WO 91/10425 se describe un sistema para encapsular células vivas. Se han descrito, y son también conocidas para los expertos en la materia, técnicas para formular una variedad de otros medios de administración sostenida o controlada, tales como vehículos liposómicos, partículas bioerosionables o perlas. Las células, con o sin encapsulación, pueden ser implantadas en tejidos corporales u órganos adecuados del paciente.
- Una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprenda un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención que se une a la IL-1 β dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos tales como la indicación para la cual se use la composición, la vía de administración y la condición del sujeto. Las composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz para tratar una condición relacionada con las IL-1. Una "cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz" de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención que se une a la IL-1 β es aquella cantidad que puede tratar o prevenir uno o más síntomas de una enfermedad relacionada con la IL-1 en un sujeto.
- En consecuencia, puede ser deseable valorar la dosificación del anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención que se une a la IL-1 β y modificar la vía de administración según se requiera para obtener el efecto terapéutico óptimo. Los intervalos de dosificación incluyen desde aproximadamente 0,1 ng/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg o más (en términos de la cantidad de agente activo por unidad de peso corporal del sujeto a quien se le administre el agente activo), en función de los factores que se han mencionado anteriormente. En otras realizaciones, los intervalos de dosificación son desde aproximadamente 0,1 μ g/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg, desde aproximadamente 1 μ g/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg, desde aproximadamente 5 μ g/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg, desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg, o desde

aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg. Pueden ser apropiadas otras dosificaciones. La composición se puede administrar como dosis única, o como dos o más dosis (que pueden contener o no contener la misma cantidad de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención de unión a la IL-1 β) a lo largo del tiempo, o como infusión continua mediante dispositivo de implantación o catéter, por ejemplo.

5

Métodos de uso

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, ácidos nucleicos, vectores, células y composiciones de la invención (en conjunto "los compuestos y composiciones de la invención") se pueden usar con cualquier finalidad. Por ejemplo, los compuestos y composiciones de la invención se pueden usar para investigar mecanismos relacionados con las IL-1, así como las enfermedades y condiciones asociadas a mecanismos relacionados con las IL-1. Sin embargo, los compuestos y composiciones de la invención son especialmente útiles para tratar un sujeto (p. ej. un mamífero o un humano) que tenga necesidad de tratamiento para una condición relacionada con las IL-1, p. ej. un trastorno o enfermedad autoinmune o inflamatorio. En consecuencia, en el contexto de la invención se describe un método para tratar o prevenir una enfermedad en un mamífero, que comprende administrar a un mamífero que tenga necesidad de ello una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención, con lo cual se trata o previene la enfermedad en el mamífero. La expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de anticuerpo o fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención que es necesaria para establecer un efecto profiláctico o terapéutico. En el sentido que se le da en la presente, tratar una enfermedad o condición se define como reducir o eliminar temporal o permanentemente los síntomas o la progresión de una enfermedad o condición. Análogamente, prevenir una enfermedad o condición significa inhibir, ralentizar o prevenir temporal o permanentemente el inicio de una enfermedad o condición (o los síntomas de una enfermedad o condición).

El método que se describe en el contexto de la invención puede ser usado para tratar o prevenir cualquier enfermedad o condición relacionada con las IL-1. Por ejemplo, se contempla el uso de los presentes anticuerpos y fragmentos en la profilaxis y en el tratamiento de enfermedades o condiciones médicas mediadas por IL-1, p. ej. condiciones inflamatorias, alergias y condiciones alérgicas, cánceres, reacciones de hipersensibilidad, enfermedades autoinmunes, infecciones severas y rechazo al trasplante de órganos o tejidos. Las condiciones relacionadas con las IL-1 incluyen artritis reumatoide (RA), osteoartritis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa (UC), shock séptico, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), asma, enfermedad de injerto contra huésped, aterosclerosis, leucemia de las células T del adulto, mieloma múltiple, esclerosis múltiple, ictus y enfermedad de Alzheimer. Los presentes anticuerpos y fragmentos pueden también ser usados para tratar o prevenir el Trastorno Inflamatorio Multisistémico de Inicio Neonatal (NOMID/CINCA), la artritis idiopática juvenil de inicio sistémico, la enfermedad de Still, el CAPS o el síndrome de Muckle-Wells.

35

En general, una enfermedad o condición puede ser considerada como una enfermedad o condición relacionada con la IL-1 β si la misma va asociada a niveles elevados de IL-1 β en tejido o fluidos corporales o si células o tejidos extraídos del cuerpo producen niveles elevados de IL-1 β en cultivo.

Por ejemplo, los métodos que se describen en el contexto de la invención se pueden usar para tratar o prevenir el Trastorno Inflamatorio Multisistémico de Inicio Neonatal (NOMID/CINCA), la artritis idiopática juvenil de inicio sistémico, los Síndromes Periódicos Asociados a CIAS 1 (CAPS), la enfermedad de Still o el síndrome de Muckle-Wells.

Como otro ejemplo, los presentes métodos se pueden usar para tratar o prevenir la artritis reumatoide, la osteoartritis, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, el shock séptico, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, el asma, la enfermedad de injerto contra huésped, la aterosclerosis, la leucemia de las células T del adulto, el mieloma múltiple, la esclerosis múltiple, el ictus o la enfermedad de Alzheimer.

Todavía como ejemplo alternativo, los presentes métodos se pueden usar para tratar o prevenir la artritis idiopática juvenil de inicio sistémico, la artritis reumatoide, la osteoartritis, la aterosclerosis o la miastenia gravis.

Otros ejemplos de condiciones relacionadas con la IL-1 β son la pancreatitis aguda; el ALS; la caquexia/anorexia, incluyendo la caquexia inducida por SIDA; el asma y otras enfermedades pulmonares; la vasculitis autoinmune; los Síndromes Periódicos Asociados a CIAS1 (CAPS); el síndrome de fatiga crónica; las enfermedades asociadas a Clostridium, incluyendo la diarrea asociada a Clostridium; las indicaciones y las condiciones coronarias, incluyendo la insuficiencia cardíaca congestiva, la reestenosis coronaria, el infarto de miocardio, la disfunción miocárdica (p. ej. relacionada con sepsis) y el injerto de bypass aortocoronario; cánceres tales como el mieloma múltiple y las leucemias mielógenas (p. ej. AML y CML) y otras leucemias, así como la metástasis tumoral; la diabetes (p. ej. la diabetes insulínica); la endometriosis; el Síndrome Autoinflamatorio Familiar por Frío (FCAS); la fiebre mediterránea familiar (FMF); la fiebre; la fibromialgia; la glomerulonefritis; la enfermedad de injerto contra huésped/rechazo de trasplante; el shock hemorrágico; la hiperalgesia; la enfermedad intestinal inflamatoria; las condiciones inflamatorias de una articulación, incluyendo la artritis psoriásica (así como la osteoartritis y la artritis reumatoide); la enfermedad ocular inflamatoria como la que puede ir asociada a trasplante corneal, por ejemplo; la isquemia, incluyendo la isquemia cerebral (p. ej. una lesión cerebral como resultado de trauma, epilepsia, hemorragia o ictus, cada uno de los cuales

60

puede conducir a neurodegeneración); la enfermedad de Kawasaki; el deterioro del aprendizaje; las enfermedades pulmonares (p. ej. el ARDS); las miopatías (p. ej. el metabolismo de la proteína muscular, especialmente en sepsis); la neurotoxicidad (p. ej. la inducida por HIV); la osteoporosis; el dolor, incluyendo el dolor relacionado con el cáncer; la enfermedad de Parkinson; la enfermedad periodontal; el parto pretérmino; la psoriasis; la lesión por reperfusión; los efectos secundarios de la terapia con radiación; la perturbación del sueño; la enfermedad de la articulación temporomandibular; el síndrome de fiebre periódica asociada al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAPS); la uveitis; o una condición inflamatoria resultante de esguince, distensión, daño de un cartílago, trauma, cirugía ortopédica, infección u otros procesos de enfermedad.

También se contempla el uso de los presentes anticuerpos y fragmentos en el tratamiento de receptores de trasplantes de corazón, pulmón, corazón y pulmón en combinación, hígado, riñón, pancreáticos, de piel o corneales, incluyendo el rechazo de un aloinjerto o el rechazo de un xenoinjerto, o para la prevención de la enfermedad de injerto contra huésped, tal como a continuación de un trasplante de médula ósea, o la arterioesclerosis asociada a un trasplante de órgano.

Se contempla el uso de los presentes anticuerpos y fragmentos en el tratamiento o la prevención de la enfermedad autoinmune o de condiciones inflamatorias, en particular de condiciones inflamatorias con una etiología que incluye un componente autoinmune tal como artritis (por ejemplo la artritis reumatoide, la artritis crónica progresiva y la artritis y las enfermedades reumáticas, incluyendo las condiciones inflamatorias y las enfermedades reumáticas que suponen pérdida de hueso, el dolor inflamatorio, la hipersensibilidad (incluyendo tanto la hipersensibilidad de las vías aéreas como la hipersensibilidad dérmica) o las alergias. Las enfermedades autoinmunes específicas para las cuales pueden utilizarse los presentes anticuerpos y fragmentos incluyen los trastornos hematológicos autoinmunes (incluyendo p. ej. la anemia hemolítica, la anemia aplásica, la anemia pura de glóbulos rojos y la trombocitopenia idiopática), el lupus eritematoso sistémico, la policondritis, el esclerodoma, la granulomatosis de Wegener, la hepatitis activa crónica, la miastenia gravis, la psoriasis, el síndrome de Steven-Johnson, la esprue idiopática, la enfermedad intestinal inflamatoria autoinmune (incluyendo p. ej. la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn y el Síndrome del Intestino Irritable), la enfermedad endocrina de Graves, la sarcoidosis, la esclerosis múltiple, la cirrosis biliar primaria, la diabetes juvenil (la diabetes mellitus tipo I), la uveitis (anterior y posterior), la queratoconjuntivitis sicca y la queratoconjuntivitis vernal, la fibrosis pulmonar intersticial, la artritis psoriásica o la glomerulonefritis (con y sin síndrome nefrótico, p. ej. incluyendo el síndrome nefrótico idiopático o la nefropatía de cambio mínimo).

También se contempla el uso de los presentes anticuerpos y fragmentos en el tratamiento, la prevención o el mejoramiento del asma, de la bronquitis, de la neumoconiosis, del enfisema pulmonar y de otras enfermedades obstructivas o inflamatorias de las vías aéreas. Los anticuerpos o fragmentos para tratar reacciones inflamatorias agudas e hiperagudas no deseables las cuales son mediadas por IL-1 se pueden usar para tratar estados que suponen la producción especialmente o la promoción de la liberación de TNF por IL-1, p. ej. infecciones agudas, por ejemplo el shock séptico (p. ej. el shock endotóxico y el síndrome de distrés respiratorio del adulto), la meningitis, la neumonía; y las quemaduras severas; y para el tratamiento de la caquexia o síndrome de consunción asociado a liberación mórbida de TNF, consiguiente a infección, cáncer, o disfunción orgánica, especialmente caquexia relacionada con SIDA, p. ej. asociada o consiguiente a infección por HIV.

También se contempla el uso de los presentes anticuerpos y fragmentos para tratar enfermedades del metabolismo óseo incluyendo la osteoartritis, la osteoporosis y otras artritis inflamatorias y la pérdida ósea en general, incluyendo la pérdida ósea relacionada con la edad, y en particular la enfermedad periodontal.

También se contempla el uso de los presentes anticuerpos y fragmentos en el tratamiento o la prevención de Síndromes Periódicos Asociados a CIAS1 (CAPS), incluyendo cada uno de Trastorno Inflamatorio Multisistémico de Inicio Neonatal (NOMID), Síndrome de Muckle-Wells (MWS) y Síndrome Autoinflamatorio Familiar por Frío (FCAS). Las mutaciones en el gen CIAS1 se reconocen actualmente como responsables de tres síndromes genéticos raros: Trastorno Inflamatorio Multisistémico de Inicio Neonatal (NOMID), Síndrome de Muckle-Wells (MWS) y Síndrome Autoinflamatorio Familiar por Frío (FCAS). (Hoffman et al. 2001 *Nature* 29:301-305; Feldmann et al. 2002 *Am J Hum Genet* 71:198-203; Aksentijevich et al. 2002 *Arthritis Rheum* 46:3340-3348). En conjunto, estas condiciones se conocen como "CAPS". El CIAS1 codifica una proteína llamada NALP3 que es un componente del "inflamatosoma", un complejo enzimático subcelular que regula la actividad de la caspasa 1. La caspasa 1 es la enzima que escinde la proforma inactiva de la citoquina proinflamatoria, IL-1, transformándola en su forma biológicamente activa (Agostini et al. 2004 supra). Las mutaciones en el CIAS1 conducen a una producción incrementada de IL-1.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención se administra típicamente al mamífero o humano en forma de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que son adecuadas para ser usadas conjuntamente con el método para tratar o prevenir una enfermedad son como se ha descrito aquí anteriormente.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención se puede administrar al mamífero en

calidad de único agente activo, o conjuntamente con otro u otros agentes que perturben la señalización de los receptores de IL-1. Un agente que perturbe la señalización de los receptores de IL-1 puede ser cualquier compuesto o composición que inhiba una interacción entre la IL-1 β y el receptor de IL-1. Por ejemplo, los agentes que perturban la señalización de los receptores de IL-1 incluyen anticuerpos que se unen a la IL-1 β o al receptor de IL-1, IL-1Ra recombinante (p. ej. de Amgen Inc., Thousand Oaks, CA), y péptidos "trampa" de receptor de IL-1 (p. ej. de Regeneron Inc., Tarrytown, NY). Cuando se usen dos o más agentes que perturben la señalización de los receptores de IL-1, los mismos se pueden administrar conjuntamente (p. ej. en una única composición farmacéutica), o se pueden administrar por separado (p. ej. en composiciones farmacéuticas independientes).

El anticuerpo, fragmento, ácido nucleico o vector de la invención se puede administrar a un mamífero en combinación o conjuntamente con otro u otros agentes activos para tratar o prevenir enfermedades o condiciones mediadas por IL-1 como las expuestas anteriormente.

Usos diagnósticos

Además de los usos terapéuticos, los presentes anticuerpos y fragmentos se pueden usar en métodos diagnósticos para detectar IL-1 β (por ejemplo en una muestra biológica tal como suero o plasma), usando un inmunoensayo convencional tal como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica tisular. Un método para detectar IL-1 β en una muestra biológica puede comprender los pasos de poner a una muestra biológica en contacto con uno o más de los presentes anticuerpos o fragmentos y detectar o bien el anticuerpo o fragmento unido a la IL-1 β o bien el anticuerpo o fragmento no unido, para con ello detectar la IL-1 β en la muestra biológica. El anticuerpo o fragmento se puede etiquetar directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Las sustancias detectables adecuadas incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos adecuados de grupos prostéticos incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, fluoresceína isotiocianato, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y los ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

En lugar de etiquetar el anticuerpo, la IL-1 β se puede someter a ensayo en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo de competición utilizando patrones de IL-1 β etiquetados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-IL-1 β no etiquetado. En este ensayo se combinan la muestra biológica, los patrones de IL-1 β etiquetados y el anticuerpo anti-IL-1 β y se determina la cantidad de patrón de IL-1 β etiquetado unida al anticuerpo no etiquetado. La cantidad de IL-1 β en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón de IL-1 β etiquetado unido al anticuerpo anti-IL-1 β .

Ejemplos

Los ejemplos siguientes ilustran adicionalmente la invención.

En los Ejemplos siguientes se hace referencia a varios anticuerpos, entre los que se incluyen los anticuerpos denominados AB1, AB5 y AB7. Como se ha mencionado anteriormente, el AB1 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 9. El AB5 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 8 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 9. El AB7 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 15 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 11.

Para varias comparaciones en los Ejemplos siguientes, se hace referencia a un anticuerpo denominado AB-control, que es un anticuerpo disponible comercialmente con una afinidad relativamente alta para la IL-1 β . El AB-control es un anticuerpo murino del que se cree que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de ID SEC N°: 40 y una cadena ligera que comprende la secuencia de ID SEC N°: 41. Estas secuencias murinas se exponen en la Publicación de Solicitud de Patente U.S. N° 2003/0026806, en las Figuras 6A y 6B.

En varios de los Ejemplos que se dan a continuación, se muestra que el AB5 y el AB7 tienen una afinidad inesperadamente mayor para la IL-1 β humana que para el AB-control.

Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra las afinidades de unión de ciertos anticuerpos de los que se describen en el contexto de la invención para la IL-1 β .

Los anticuerpos denominados AB1 y AB5 se sometieron a ensayo en relación con sus propiedades de unión a la IL-1 β usando un dispositivo KINEXA™ (de Sapidyn Instruments Inc., Boise, ID). Se proporcionan en las Figs. 2 y 3 las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos AB1 y AB5. Se sometió a ensayo a efectos comparativos un anticuerpo disponible comercialmente que tiene una afinidad relativamente alta para la IL-1 β (denominado aquí AB-control).

Están resumidos en la Tabla 1, los resultados de los ensayos de unión a la IL-1 β . Los valores K_D representan las constantes de disociación de la unión para los complejos respectivos anticuerpo-IL-1 β . La K_D se calculó como la relación de la "velocidad de disociación" (velocidad de disociación para el complejo anticuerpo-IL-1 β) con respecto a la "velocidad de asociación" (velocidad de asociación para el complejo anticuerpo-IL-1 β). Una K_D menor es indicativa de una mayor afinidad del anticuerpo.

Tabla 1: Resultados de unión a la IL-1 β

Anticuerpo	K_D (pM)
AB-control	3,06
AB1	18,63
AB5	0,261

Los resultados de estos experimentos muestran que el AB1 y el AB5 se unen con alta afinidad a la IL-1 β . Las afinidades de los anticuerpos de la invención para IL-1 β son comparables a la afinidad de unión del AB-control para la IL-1 β , o mejores que esta última.

Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra la inhibición *in vitro* de la IL-1 β usando anticuerpos que se describen en el contexto de la invención.

Las potencias inhibitorias de los anticuerpos AB1 y AB5 para la IL-1 β (véase el Ejemplo 1) se evaluaron usando un bioensayo que mide la liberación, estimulada por IL-1 β , de IL-6 desde fibroblastos humanos. Como en el Ejemplo 1, se usó como muestra comparativa a AB-control. Los detalles del ensayo se describen en Dinarello et al., *Current Protocols in Immunobiology*, Ch 6.2.1-6.2.7, John Wiley and Sons Inc., Hoboken, NJ, 2000. Resumiendo, fibroblastos MRC5 humanos de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) de Manassas, VA (N° CCL-171 de la ATCC) fueron cultivados hasta la confluencia en placas multipocillo. Las células se trataron con dosis tituladas de anticuerpo AB5. Las células fueron a continuación puestas en contacto con (i) 100 pg/ml de IL-1 β o (ii) 100 pg/ml de IL-1 β y anticuerpo AB1 ó AB5 (del Ejemplo 1). Las células de control negativo no se estimularon con IL-1 β . Las cantidades de IL-6 liberada en cada grupo de células tratadas se midieron usando un kit IL-6 ELISA de BD Pharmingen (Franklin Lakes, NJ) según las instrucciones del fabricante. Los resultados de los análisis ELISA se representan en la Fig. 5 y se resumen en la Tabla 2. La IC₅₀ es la concentración de anticuerpo requerida para inhibir el 50% de la IL-6 liberada por la estimulación con IL-1 β .

Tabla 2: Resultados de ELISA

Anticuerpo	IC ₅₀ (pM)
AB-control	0,017
AB1	0,15
AB5	0,014

Estos resultados demuestran la potencia *in vitro* de los anticuerpos para inhibir la IL-1 β . Además se ha demostrado que la inhibición de la liberación de citoquina, estimulada por IL-1 β , en MRC 5 guarda correlación con la capacidad del agente para inhibir la actividad mediada por IL-1 *in vivo*. Así, estos resultados indican que los anticuerpos tendrán eficacia inhibitoria de la IL-1 β *in vivo*.

Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra la inhibición *in vivo* de IL-1 β usando anticuerpos según se describe en el contexto de la invención.

Para confirmar la eficacia *in vivo* del AB5, su capacidad para bloquear la actividad biológica de la IL-1 β humana se sometió a prueba en ratones. Los detalles del ensayo se describen en Economides et al., *Nature Med.*, 9: 47-52 (2003). Resumiendo, a ratones C57/B16 macho (Jackson Laboratory Bar Harbor, Maine) les fueron inyectadas intraperitonealmente dosis tituladas de AB5 (Ejemplo 1), AB-control (Ejemplo 1) o IgG de control (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Veinticuatro horas después de la inyección de los anticuerpos les fue inyectada a los ratones por vía subcutánea IL-1 β humana recombinante (rhIL-1 β) (de PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ) a razón de una dosis de 1 μ g/ kg. A las dos horas postinyección de rhIL-1 β (tiempo para la respuesta máxima de IL-6) los ratones fueron sacrificados y se extrajo y se procesó sangre para la obtención del suero. Los niveles de IL-6 en suero se sometieron a ensayo mediante ELISA (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ) según el protocolo del fabricante. La inhibición porcentual se calculó a partir de la relación de IL-6 detectada en el suero de los animales experimentales con respecto a la IL-6 detectada en el control (multiplicada por 100).

Los resultados se exponen en la Fig. 6. La capacidad para inhibir la actividad *in vivo* de la IL-1 β se evalúa en función de los niveles de IL-6 estimulada con IL-1 β , en suero. Como se ilustra en la Fig. 6, el anticuerpo AB5 fue igual de eficaz, cuando no más, que el AB-control para inhibir la actividad *in vivo* de la IL-1 β humana. 3 μ g de AB5 fueron en este ensayo tan eficaces como 10 μ g de AB-control.

Así, los resultados indican que los anticuerpos sometidos a prueba son útiles para la inhibición de la actividad de IL-1 β *in vivo*. Estos resultados también muestran que una única inyección de AB5 puede bloquear la acción sistémica frente a la estimulación con IL-1 β durante un periodo de tiempo prolongado.

Ejemplo 4

El ejemplo siguiente ilustra la preparación de un anticuerpo según se describe en el contexto de la invención.

Se generaron varias secuencias de anticuerpos modificados por ingeniería para humanos usando la tecnología HUMAN ENGINEERING™ tal como se describe en Studnicka et al., *Protein Engineering*, 7: 805-814 (1994), y en las Patentes U.S. 5.766.886, 5.770.196, 5.821.123 y 5.869.619 y en la Publicación de Solicitud PCT WO 93/11794. Las secuencias generadas de anticuerpos modificados por ingeniería para humanos incluyen AB5.1, AB5.2, AB5.3 y AB5.4. Como se muestra en las Figs. 3 y 4, cada una de estas secuencias comprende dos posiciones variables en la región CDR-3H que están indicadas con X₁ y X₂. Así, en ciertos ejemplos de cada uno de estos anticuerpos modificados por ingeniería para humanos, X₁ y X₂ de la CDR3 se corresponden con alanina y arginina, valina y arginina, fenilalanina y arginina, lisina y lisina o asparagina y arginina, respectivamente.

Ejemplo 5

Los anticuerpos denominados AB5 y AB7 (una secuencia de anticuerpo modificado por ingeniería para humanos) se sometieron a ensayo en relación con las propiedades de unión a la IL-1 β usando un ensayo de exclusión cinética llevado a cabo en un dispositivo KINEXA™ de una manera como la que se describe en el Ejemplo 1. Una descripción adicional acerca de los dispositivos KINEXA™ y su funcionamiento para la caracterización de anticuerpos está disponible en el fabricante y puede encontrarse en la bibliografía publicada, por ejemplo en la Patente U.S. N° 6.664.114 (Sapidyne, Inc.); y en Darling et al., "Kinetic Exclusion Assay Technology: Characterization of Molecular Interactions" ASSAY and Drug Development Technologies, 2004, 2, 647-657. El dispositivo KINEXA™ realiza un ensayo de exclusión cinética y ajusta los datos a varias curvas teóricas y así determina la K_D así como otras propiedades, tales como los intervalos de confianza del 95% para K_D. El dispositivo KINEXA™ es en general más sensible que otros dispositivos (p. ej. un dispositivo BiaCore) para el análisis de características de afinidad tales como las constantes de disociación y las velocidades de disociación.

Se presentan en las Figs. 3 y 4A respectivamente las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera de AB5 y AB7. Están resumidos en la Tabla 3 los resultados de los ensayos de unión a la IL-1 β . Como en el Ejemplo 1, la K_D se calculó como la relación de la "velocidad de disociación" con respecto a la "velocidad de asociación", y una K_D menor es indicativa de una mayor afinidad del anticuerpo.

Tabla 3

Anticuerpo	K _D (pM)
AB5	0,24
AB7	0,30

Los resultados de estos experimentos muestran que el AB5 (en consonancia con los resultados observados en el Ejemplo 1) y el AB7 se unen a la IL-1 β con una afinidad inesperadamente alta, lo cual queda representado por los valores inesperadamente bajos de sus constantes de disociación.

Las Figs. 7, 8 y 9 muestran las afinidades de unión de anticuerpos denominados AB1, AB5 y AB7, respectivamente, según determinación efectuada a partir de un experimento representativo para cada uno usando el análisis KINEXA. La Fig. 7 refleja los resultados que se han expuesto en la Tabla 1, mientras que las Figs. 8 y 9 reflejan los resultados que se exponen en la Tabla 3.

Además de los valores que se exponen en la Tabla 3, los resultados de los ensayos KINEXA también indican los intervalos de confianza del 95% bajos y altos (K_D baja y K_D alta). Para AB5, la K_D baja era 0,07pM, y la K_D alta era 0,72pM. Para el AB7, la K_D baja era 0,11pM, y la K_D alta era 0,74pM.

Se hallaron valores similares de K_D baja y de K_D alta en el ensayo que se expone en el Ejemplo 1. Para el AB-control, la K_D baja era 1,62pM, y la K_D alta era 5,23pM. Para AB1, la K_D baja era 13,38pM, y la K_D alta era 24,84pM. Para AB5, la K_D baja era 0,11pM, y la K_D alta era 0,56pM.

Los resultados de los ensayos KINEXA indican que AB5 y AB7 tenían una constante de disociación inesperadamente menor que la del AB-control.

Ejemplo 6

Este ejemplo ilustra la inhibición *in vitro* de la liberación de IL-6 estimulada por IL-1 β . Se sometió a ensayo para varios anticuerpos de la presente invención como se indica a continuación la IC₅₀ para inhibir la liberación de IL-6 desde fibroblastos humanos estimulada por IL-1 β .

La potencia inhibitoria de los anticuerpos AB5 y AB7 para IL-1 β se evaluó de una manera como la que se describe en el Ejemplo 2, usando un bioensayo que mide la liberación de IL-6 desde fibroblastos humanos estimulada por IL-1 β . Las Figs. 10 a 12 muestran curvas de unión para ensayos individuales sobre varios anticuerpos. La Fig. 10 muestra la inhibición de la liberación de IL-6 desde fibroblastos humanos producida por anticuerpos denominados AB1, AB2 y AB3, y los resultados de estos tres ensayos individuales indicaron que AB1 tenía una IC₅₀ de 0,029nM (29pM), AB2 tenía una IC₅₀ de 0,076nM (76pM), y AB3 tenía una IC₅₀ de 0,214nM (214pM). La Fig. 11 muestra la inhibición de la liberación de IL-6 desde fibroblastos humanos producida por anticuerpos denominados AB1 y AB7 en un ensayo adicional. La Fig. 12 muestra la inhibición de la liberación de IL-6 desde fibroblastos humanos producida por anticuerpos AB5 y AB7, así como por el Kineret[®] disponible comercialmente. Los resultados indicaron que el AB5 y el AB7 tenían con respecto a la inhibición de la IL-1 β una potencia sustancialmente mejor que la del Kineret[®], sobre la base de las determinaciones de la IC₅₀ en los ensayos. Kineret[®] es una proteína hecha por el hombre que es similar a una proteína que se da de manera natural denominada antagonista del receptor de interleuquina-1 (IL-Ira) hallada en el cuerpo. Las Figs. 10 a 12 muestran resultados de ensayos individuales para la potencia de los anticuerpos o del Kineret[®] en términos de la inhibición porcentual de la IL-6 sin el anticuerpo, y la Tabla 4 muestra la IC₅₀ calculada a partir de dichos ensayos individuales. La IC₅₀ es la concentración de anticuerpo o de Kineret[®] requerida para inhibir el 50% de la IL-6 liberada por estimulación con IL-1 β .

Tabla 4

Anticuerpo	IC ₅₀ (Nm)
AB5	0,0049 (4,9pM)
AB7	0,0044 (4,4pM)
Kineret	0,0454 (45,4pM)

Además de los resultados de los ensayos individuales que se indican en las Tablas 2 y 4 y que se muestran en las Figuras 6, 10, 11 y 12, se llevaron a cabo otros ensayos individuales para cada uno de AB1, AB7 y AB-control. A partir de los resultados de los ensayos individuales puede calcularse una IC₅₀ media. Se calculó una IC₅₀ media para el AB1 de 66,7pM a partir de resultados de ensayos individuales de 35pM, 30pM, 150pM (este valor se muestra también en la Tabla 2) y 52pM. Se calculó una IC₅₀ media para AB7 de 5,6pM a partir de resultados de ensayos individuales de 7,3pM, 4,2pM, 4,5pM, 4,4pM (este valor se muestra también en la Tabla 4), 6,0pM, 5,0pM y 7,8pM. Se calculó una IC₅₀ media para AB-control de 8,9pM a partir de resultados de ensayos individuales de 5,0pM, 17,0pM (este valor se muestra también en la Tabla 2) y 4,9pM.

Estos resultados demuestran la potencia *in vitro* de AB1, AB5 y AB7 para inhibir la IL- β . Además se ha demostrado que la inhibición de la liberación de citoquina estimulada por IL-1 β en fibroblastos humanos está en correlación con la capacidad del agente inhibidor para inhibir la actividad mediada por IL-1 *in vivo*. Así, estos resultados indican que los anticuerpos de la invención tendrán eficacia inhibitoria de la IL-1 β *in vivo*.

Ejemplo 7

Este ejemplo ilustra la inhibición *in vivo* de IL-1 β usando anticuerpos de unión a la IL-1 β .

La eficacia *in vivo* de AB5, AB1 y AB7 y su capacidad para bloquear la actividad biológica de la IL-1 β humana se sometieron a prueba en ratones de una manera como la que se describe en el Ejemplo 3. Los resultados de las pruebas efectuadas con AB5 y AB1 se exponen en la Fig. 13, y los resultados de las pruebas efectuadas con AB5 y AB7 se exponen en la Fig. 14. La capacidad para inhibir la actividad *in vivo* de la IL-1 β se evaluó en función de los niveles de IL-6 en suero por estimulación con IL-1 β . Como se ilustra en las Figs. 13 y 14, los anticuerpos AB1, AB5 y AB7 resultaron eficaces para inhibir la actividad *in vivo* de la IL-1 β humana.

Estos resultados indican que los anticuerpos sometidos a prueba son útiles para la inhibición de la actividad de IL-1 β *in vivo*.

Ejemplo 8

Este Ejemplo ilustra que al menos algunos anticuerpos de unión a la IL-1 β según la presente invención presentan reactividad cruzada con IL-1 β de algunos mamíferos distintos de los humanos y no presentan reactividad cruzada con IL-1 β de otros mamíferos no humanos. El anticuerpo denominado AB7 (un anticuerpo que se une a la IL-1 β humana con

alta afinidad) se sometió a ensayo en relación con la unión a la IL-1 β de mamíferos no humanos, concretamente el macaco rhesus, el mono cynomolgus, el perro, la cobaya y el conejo.

Se obtuvo de Charles River Labs sangre entera heparinizada reciente de macaco rhesus, mono cynomolgus, perro, cobaya y conejo. La sangre entera se separó por centrifugación por gradiente de densidad Ficoll y se aislaron células mononucleares de la sangre periférica (PBMC's). Para las PBMC de cada especie se incubaron 2,5 x 10⁵ células/ml en medios RPMI periféricos con y sin 50 ng/ml de Lipopolisacárido LPS (E. coli 055:B5), y se recogieron sobrenadantes a las 24 horas post-estimulación. El LPS está destinado a estimular la producción de IL-1 β por parte de las PBMC's. 2 ml de cada sobrenadante se incubaron por espacio de 3 horas con 2 μ g de AB7, efectuándose a continuación la adición de 50 μ l de lechada de perlas de proteína A-Sefarosa para inmunoprecipitar el complejo AB7/IL-1 β . IL-1 β humana (Peprotech) se adicionó a RPMI y la misma se usó como controles de inmunoprecipitación/Western blot. Tras centrifugación y lavado de las perlas de Proteína A-Sefarosa, todas las muestras se cargaron en un gel para SDS-PAGE y se pasaron a 120 V por espacio de 1 hora. Después de una transferencia a membrana Immobilon-P a 22 V durante la noche y de bloqueo con leche desnatada al 5%, se incubó AB7 a razón de 2 μ g/ml con la membrana por espacio de 2 horas. Se adicionó un anticuerpo IgG anti-humana de cabra secundaria conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) tras los pasos de lavado y la detección se efectuó con solución de tetrametilbencidina (TMB) monocomponente.

Las Figs. 15 y 16 muestran los Western blots obtenidos a partir de este procedimiento. En el lado izquierdo del blot que se muestra en la Fig. 15 (carriles 1 a 3) están los controles en los cuales se adicionaron a los medios RPMI cantidades variables (5 ng, 10 ng y 20 ng) de IL-1 β humana. Cerca de la parte inferior del blot pueden verse bandas en cada uno de los carriles en una región que se corresponde con un peso molecular de aproximadamente 17 kDa. Estas bandas son indicativas de la unión de AB7 a IL-1 β humana. El carril central (carril 4) es los medios RPMI. En el lado derecho del blot que se muestra en la Fig. 15 (carriles 5 a 8), se muestran los resultados para las muestras de mono cynomolgus y macaco rhesus. Los carriles 5 y 6 son las muestras de mono cynomolgus sin LPS y con 50 ng de LPS adicionados a los medios RPMI, respectivamente. Los carriles 7 y 8 son las muestras de macaco rhesus sin LPS y con 50 ng de LPS adicionados a los medios RPMI, respectivamente. Cerca de la parte inferior del Western blot pueden verse bandas en los Carriles 6 y 8 (las muestras a las cuales se les adicionó LPS) en una región que se corresponde con un peso molecular de aproximadamente 17 kDa. Estas bandas en los Carriles 6 y 8 son indicativas de reactividad cruzada de AB7 con IL-1 β de primate, concretamente IL-1 β de mono cynomolgus y macaco rhesus.

La Fig. 16 muestra Western blots para controles y muestras de PBMC's de perro, cobayas y conejos. En el lado izquierdo de los blots que se muestran en la Fig. 16 (carriles 1 a 4) están los controles en los cuales se adicionaron a los medios RPMI cantidades variables (5 ng, 10 ng, 50 ng y 200 ng) de IL-1 β humana. Cerca de la parte inferior del blot pueden verse bandas en cada uno de los carriles en una región que se corresponde con un peso molecular de aproximadamente 17 kDa. Estas bandas son indicativas de la unión de AB7 a IL-1 β humana. El carril 5 en la Fig. 15 es los medios RPMI. Los carriles 6 a 8 son los resultados para las muestras de PBMC's de perro, sin LPS y con 50 ng de LPS y 200 ng de LPS, respectivamente. Los carriles 9 y 10 son los resultados para las muestras de PBMC's de cobaya, sin LPS y con 50 ng de LPS, respectivamente. Los carriles 11 y 12 son los resultados para las muestras de PBMC's de conejo, sin LPS y con 50 ng, respectivamente. Cerca de la parte inferior del Western blot pueden verse bandas en los Carriles 7, 8 y 12 (las muestras de perro y conejo a las cuales se les adicionó LPS) en una región que se corresponde con un peso molecular de aproximadamente 17 kDa. Estas bandas en los Carriles 7, 8 y 12 son indicativas de reactividad cruzada de AB7 con IL-1 β de perro e IL-1 β de conejo. La ausencia de una banda visible en el Carril 10 (PBMC de cobaya con adición de 50 ng de LPS) indica que el AB7 no presentaba reactividad cruzada con IL-1 β de cobaya.

Estos resultados indican que el AB7 presenta reactividad cruzada con IL-1 β de varios mamíferos no humanos, concretamente de macaco rhesus, mono cynomolgus, perro y conejo, pero no presenta reactividad cruzada con IL-1 β de al menos otro mamífero no humano, concretamente de cobaya.

Ejemplo 9

Este Ejemplo ilustra adicionalmente que al menos algunos anticuerpos de unión a la IL-1 β según la presente invención presentan reactividad cruzada con IL-1 β de otros mamíferos no humanos. El anticuerpo AB7 se sometió a ensayo en relación con la unión a IL-1 β de mamíferos no humanos, concretamente de ratón y de rata.

IL-1 β recombinantes de rata, de ratón y humana (Peprotech) se cargaron en condición reductora y no reductora en un gel para SDS-PAGE y se pasaron a 120 V por espacio de 1 hora. A continuación de una transferencia a membrana Immobilon-P a 22 V durante la noche y un bloqueo con leche desnatada al 5%, se incubó AB7 a razón de 2 μ g/ml con la membrana por espacio de 2 horas. Un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG humana conjugado con HRP se adicionó tras los pasos de lavado y la detección se efectuó con solución de TMB monocomponente.

La Fig. 17 muestra el Western blot obtenido mediante los procedimientos anteriormente indicados. Los carriles 1 y 2 son para IL-1 β humana no reducida y reducida, respectivamente. Los carriles 3 y 4 son para IL-1 β de ratón no reducida y reducida, respectivamente. Los carriles 5 y 6 son para IL-1 β de rata no reducida y reducida, respectivamente. En la

parte inferior del blot pueden verse bandas en cada uno de los carriles en una región que se corresponde con un peso molecular de aproximadamente 17 kDa. Estas bandas son indicativas de la presencia de IL-1 β , lo cual es a su vez indicativo de la unión de AB7 a IL-1 β humana, a IL-1 β de ratón y a IL-1 β de rata. Estos resultados indican que el AB7 presenta reactividad cruzada con IL-1 β de roedor.

Ejemplo 10

Este Ejemplo ilustra adicionalmente que al menos algunos anticuerpos de unión a la IL-1 β según la presente invención son inhibidores de IL-1 β de humanos y de al menos algunos mamíferos no humanos. El anticuerpo AB7 se sometió a ensayo en relación con la inhibición de la proliferación de células D10 estimulada por IL-1 β de humano, de macaco rhesus, de ratón y de rata.

Las células D10.G4.1 (D10) son células auxiliares T murinas con especificidad para el antígeno conalbumina de clara de huevo. Esta línea celular fue obtenida del ratón AKR/J (haplotipo H-2^k MHC) y requiere activación del receptor del antígeno e IL-1 para su crecimiento, proliferación y supervivencia. La línea celular D10 es altamente sensible a las IL-1 y puede responder a las IL-1 de varias especies (incluyendo los humanos, el mono, el ratón y la rata), lo cual permite someter a prueba el potencial neutralizante en reactividad cruzada de un anticuerpo o fragmento que se una a la IL-1 β , tal como el AB7. La proliferación de D10 no se ve afectada por LPS o por citoquinas derivadas de macrófagos tales como la IL-6 y el TNF- α . Como resultado de ello, los ensayos con D10 se pueden usar para valorar la actividad de IL-1 específica, de fuentes endógenas (es decir, macrófagos activados por LPS).

Células D10 se activaron con Concanavalina A (Con A) y un nivel constante de fuente recombinante o nativa de IL-1 en presencia o en ausencia de varias concentraciones de AB7. Las células se sembraron en placas a razón de 2×10^4 /pocillo y se estimularon con 2,5 μ g/ml de Con A y distintas concentraciones de IL-1 β . Las células se cultivaron por espacio de 72 horas y la proliferación se midió adicionando el colorante de viabilidad redox Alamar Blue durante las últimas entre 8 y 14 horas de cultivo y evaluando la O.D.₅₇₀₋₆₀₀.

Para someter a prueba la potencia y la reactividad cruzada entre las especies de AB7, se llevó a cabo el bioensayo con D10 usando las siguientes concentraciones de IL-1 β recombinante o nativa: 10 pg/ml de IL-1 β humana recombinante; 10 pg/ml de IL-1 β de rhesus recombinante; 10 pg/ml de IL-1 β de ratón; y 100 pg/ml de IL-1 β de rata. Para el ensayo con D10 utilizando IL-1 β humana endógena se usó una dilución 1:360 de sobrenadante de PBMC's humanas activadas con LPS. Distintas concentraciones de AB7 se sometieron a prueba con cada IL-1 β . Las mediciones de la IC₅₀ se determinaron usando Graphpad Prism. La media, la desviación estándar (SD) y el error estándar (SEM) para la IC₅₀ se calcularon usando Microsoft Excel.

Los resultados del ensayo con D10 se resumen en la Tabla 5, que incluye la IC₅₀ media y el SEM (sobre la base de 4 experimentos para IL-1 β humana recombinante y 3 experimentos para la IL-1 β de otras fuentes). El AB7 resultó altamente potente para neutralizar IL-1 β humana recombinante e IL-1 β humana producida de manera endógena (nativa). El AB7 resultó también altamente potente para neutralizar IL-1 β de macaco rhesus recombinante. El AB7 también neutralizaba IL-1 β de ratón recombinante con una potencia menor, con una IC₅₀ que era 1000 veces mayor en comparación con la humana. El AB7 no presentó actividad significativa alguna contra IL-1 β de rata en este ensayo.

Tabla 5: Resultados de ELISA

	IC ₅₀ (pM)	SEM (pM)
IL-1 β humana recombinante	2,4	$\pm$ 0,52
IL-1 β humana de producción endógena (nativa)	2,6	$\pm$ 0,11
IL-1 β de macaco rhesus recombinante	2,7	$\pm$ 0,73
IL-1 β de ratón recombinante	2618	$\pm$ 60,9

Estos resultados indican que el AB7 es un anticuerpo neutralizante altamente potente contra IL-1 β humana, con potencia similar contra formas recombinantes y nativas de la citoquina. La actividad contra la IL-1 β del primate no humano macaco rhesus era similar a la actividad contra la IL-1 β humana. Así, al menos algunos anticuerpos y fragmentos de la presente invención abarcan anticuerpos y fragmentos que tienen sustancialmente la misma potencia contra IL-1 β humana y contra IL-1 β de primate y/o tienen sustancialmente la misma potencia contra IL-1 β humana recombinante y contra IL-1 β humana endógena. Estos resultados también indican que el AB7 también neutraliza la IL-1 β de ratón.

Ejemplo 11

Este Ejemplo ilustra el mapeo del epítipo de IL-1 β al cual se unen al menos algunos anticuerpos de la presente invención (por ejemplo el anticuerpo denominado AB7).

Se usó un conjunto de péptidos PepSpotTM (JPT Peptide Technologies, Berlín, Alemania) para identificar los residuos de aminoácidos clave de IL-1 β (epítipo) que intervienen en la unión del AB7. Se sintetizó directamente sobre una

membrana un registro de doce péptidos de aminoácidos, que abarcaba toda la secuencia de aminoácidos de la IL-1 β , solapándose cada péptido en 11 aminoácidos con el anterior. La membrana portadora de los péptidos se sondeó con AB7 a razón de una concentración de 2 μ g/ml por espacio de 2 h a temperatura ambiente. La unión de AB7 a péptidos unidos a la membrana se detectó usando un anticuerpo secundario anti-humano de cabra conjugado con HRP, efectuándose a continuación quimioluminiscencia mejorada (ECL). Las manchas de péptidos correspondientes a los residuos 83 a 105 de la IL-1 β puntuaron positivo para la unión a AB7.

Este mapeo indica que el AB7 se une a un epítipo dentro de la secuencia correspondiente a los residuos 83 a 105 de la proteína IL-1 β madura. La secuencia comprende los aminoácidos ESDPKNYPKKKMEKRFVFNKIE, y el AB7 es ejemplificativo de anticuerpos que se unen a un epítipo dentro de esta secuencia. Se prevé que también se unan a un epítipo contenido en esta secuencia los anticuerpos denominados AB6, AB8, AB9 y otros, tales como anticuerpos que tengan la cadena pesada de ID SEC N°: 29 y la cadena ligera de ID SEC N°: 27.

Ejemplo 12

Este ejemplo ilustra la inhibición *in vitro* de IL-1 β usando un anticuerpo de la invención en un ensayo basado en células con IL-8.

Se extrajo de donantes sanos sangre periférica heparinizada reciente. 180 μ l de sangre entera se sembraron en una placa de 96 pocillos y se incubaron con varias concentraciones del anticuerpo AB7 y rhIL-1 β 100pM. Para muestras tratadas con Kineret[®], se combinaron a 1:1, Kineret[®] y rhIL-1 β antes del mezclado con sangre. Las muestras se incubaron por espacio de 6 horas a 37°C con CO₂ al 5%. Las células de sangre entera se lisaron a continuación con 50 μ l de Triton X-100 al 2,5%. La concentración de interleuquina-8 (IL-8) en lisados clarificados se sometió a ensayo por ELISA (kit Quantikine human IL-8 ELISA, R&D Systems) según las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de IL-8 en las muestras tratadas con AB7 y con Kineret[®] se compararon con una muestra de control tratada con control anti-KLH. Los resultados se representan en la Fig. 18 y se resumen en la Tabla 6. La IC₅₀ es la concentración de anticuerpo requerida para inhibir un 50% de la IL-8 liberada por estimulación con IL-1 β .

Tabla 6

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

Estos resultados demuestran la potencia *in vitro* del AB7, según medición efectuada mediante la inhibición de la liberación de IL-8 estimulada por IL-1 β . Estos resultados, que revelan una mayor potencia en comparación con Kineret[®], indican que los anticuerpos de la invención tendrán eficacia inhibitoria de la IL-1 β *in vivo*.

Ejemplo 13

Este ejemplo ilustra que los anticuerpos de la invención tienen una afinidad sorprendentemente alta en comparación con un anticuerpo que tenga una secuencia similar.

El AB5 se comparó con el AB-control en cuanto a la secuencia y a la afinidad de unión. El AB5 comprende la región variable de cadena pesada que se expone en la ID SEC N°: 8 y la región variable de cadena ligera que se expone en la ID SEC N°: 9. Se cree que el AB-control comprende la región variable de cadena pesada que se expone en la ID SEC N°: 38 y la región variable de cadena ligera que se expone en la ID SEC N°: 39. Esas secuencias se exponen en la Publicación de Solicitud de Patente U.S. N° 2003/0026806, en las Figuras 6A y 6B. El AB5 y el AB-control tienen las mismas regiones determinantes de complementariedad en sus regiones variables de cadena pesada y ligera. Sus cadenas pesadas se diferencian en tres residuos de aminoácidos en la región de entramado 3, situada en las posiciones 68, 74 y 86 en las ID SEC N°: 8 y 38. Sus respectivas cadenas ligeras se diferencian en un residuo de aminoácido en la región de entramado 3, situada en la posición 72 en las ID SEC N°: 9 y 39. A pesar de las similitudes en las secuencias de sus regiones variables de cadena pesada y ligera, que incluyen las mismas CDRs, el AB5 y el AB-control se diferencian significativa e inesperadamente en cuanto a su afinidad de unión. Como se ha descrito en los anteriores Ejemplos 1 y 5, se observó que el AB5 tiene una constante de disociación menor que 0,3pM (con una K_D baja de 0,11pM y una K_D alta de 0,56pM), y se observó que el AB-control tiene una constante de disociación de 3pM (con una K_D baja de 1,62pM, y una K_D alta de 5,23pM). Dadas las similitudes de la secuencia de aminoácidos, es sorprendente que el AB5 tenga una afinidad mayor en un orden de magnitud.

Se generó AB7 usando tecnología HUMAN ENGINEERINGTM, como se describe en el Ejemplo 4. Las regiones variables de cadena ligera y pesada del AB7 incluyen posiciones de riesgo bajo y moderado en las secuencias de las regiones variables de cadena ligera y pesada AB5. El AB7 comprende la región variable de cadena pesada que se expone en la ID SEC N°: 15 y la región variable de cadena ligera que se expone en la ID SEC N°: 11.

El AB7 se comparó con el AB-control y con el AB5 en cuanto a la secuencia y a la afinidad de unión. El AB7 y el AB-

control tienen las mismas regiones determinantes de complementariedad en sus regiones variables de cadena pesada y ligera. Sus cadenas pesadas se diferencian en dos de las tres posiciones en la región de entramado 3 (posiciones 74 y 86 en las ID SEC N°: 15 y 38) donde el AB5 se diferenciaba del AB-control; no obstante, en la posición 68 en la ID SEC N°: 15 el AB7 tiene el mismo aminoácido que el AB-control. En la cadena ligera del AB7, la posición 72 en la ID SEC N°: 11 se diferencia tanto del AB-control como del AB5. El AB7 incluye otras diversas diferencias en las regiones variables de cadena ligera y pesada cuando se compara con el AB-control y con el AB5 en virtud del proceso HUMAN ENGINEERING™. A pesar de la inclusión de cambios en posiciones de riesgo moderado, y particularmente en vista de los cambios en AB7 en comparación con AB5 en la posición 68 en la región variable de cadena pesada y en la posición 72 en la región variable de cadena ligera, el AB7 y el AB5 tienen constantes de disociación similares, y el AB7 se diferencia significativa e inesperadamente del AB-control con respecto a la afinidad de unión. Como se ha dicho en el anterior Ejemplo 5, se observó que el AB7 tiene una constante de disociación de 0,3pM (con una K_D baja de 0,11pM y una K_D alta de 0,74pM). Se observó que el AB5 tiene una constante de disociación de 0,24pM (con una K_D baja de 0,07pM y una K_D alta de 0,72pM). Dados los cambios efectuados en posiciones de riesgo moderado, y las similitudes generales de la secuencia de aminoácidos, particularmente en las CDRs, es sorprendente que el AB7 tenga una afinidad similar a la del AB5 y una afinidad mayor que la del AB-control en un orden de magnitud.

Ejemplo 14

Este ejemplo muestra que al menos un anticuerpo de la presente invención se une a un epítipo de IL-1 β de forma tal que el anticuerpo unido sustancialmente no impide que la IL-1 β unida al anticuerpo se una al receptor tipo I de IL-1. Este Ejemplo utiliza un aparato de análisis cinético Biacore® para examinar si la IL-1 β unida a uno de los presentes anticuerpos (AB7) puede seguir uniéndose al receptor tipo I de IL-1.

Para este Ejemplo se inmovilizó AB7 sobre la superficie de un chip sensor CM-5 en un instrumento Biacore tal como se indica a continuación. Usando HBS-EP (Biacore®, Inc.) como tampón de desplazamiento, la temperatura se ajustó a 25°C, el caudal se ajustó a 10 μ l/min., y la trayectoria de flujo se dirigió a la celda de flujo 2 solamente. Se mezclaron 135 μ l de cada una de las soluciones de NHS y ECD (Biacore®, Inc.), y se inyectaron inmediatamente en la trayectoria de flujo 70 μ l de la solución de NHS/ECD. A continuación se inyectaron 91 μ l de una solución de AB7 (~20 μ g/ml en tampón de acetato sódico 10mM (Biacore®, Inc.)), seguidos por 70 μ l de Etanolamina 1M (Biacore®, Inc.). Se inmovilizaron así aproximadamente 5650 RU de AB7. Para preparar una superficie de referencia, la trayectoria de flujo se cambió a la celda de flujo 1 solamente. Se mezclaron 135 μ l de cada una de las soluciones de NHS y de ECD (Biacore®, Inc.), y se inyectaron inmediatamente en la trayectoria de flujo 70 μ l de la solución de NHS/ECD, seguidos por 70 μ l de Etanolamina 1M (Biacore®, Inc.).

El instrumento Biacore® estaba entonces listo para el análisis de si la IL-1 β unida a AB7 seguiría uniéndose al receptor tipo I de IL-1. Para este análisis se usó receptor tipo I de IL-1 soluble (IL-1 sRI), y la unión del IL-1 sRI a un complejo de AB7/IL-1 β se sometió a prueba como se indica a continuación. IL-1 sRI (N° de cat 269-1R-100/CF de RnDSYSTEMS) e IL-1 β (Peprotech, N° cat 200-01B) se diluyeron por separado hasta 10 μ g/ml en HBS-EP. El caudal se ajustó a 10 μ l/min. La trayectoria de flujo para el instrumento Biacore® se ajustó a las celdas de flujo 1 y 2, y se usó una resta de referencia de la celda de flujo 2 con respecto a la celda de flujo 1 para determinar un diferencial de respuesta. La Fig. 19 muestra el diferencial de respuesta medido a partir del instrumento Biacore® durante el transcurso del análisis. La Fig. 20 proporciona una ilustración de los pasos usados en el análisis, indicando las adiciones por separado a la celda de flujo de (A) IL-1 sRI, (B) IL-1 β y (C) IL-1 sRI, en ese orden.

A los 200 segundos se inyectaron 20 μ l de IL-1 sRI para verificar la ausencia de unión directamente a AB7 inmovilizado (inyección A en las Figs. 19 y 20). Como se muestra en la Fig. 19, el IL-1 sRI no incrementó las unidades de respuesta, lo cual indica que el IL-1 sRI no se unía directamente al AB7 inmovilizado.

A los 600 segundos, a aproximadamente 1000 RU de IL-1 β se unió AB7, formando un complejo AB7/IL-1 β sobre la superficie del chip (inyección B en las Figs. 19 y 20). El incremento de unidades de respuesta indica que la IL-1 β se unió al AB7 inmovilizado. A continuación se inyectaron 20 μ l de IL-1 sRI a los 1.200 segundos para someter a prueba la unión de IL-1 sRI al complejo de AB7 e IL-1 β . Aproximadamente 1.500 RU de IL-1 sRI se unieron al complejo AB7/IL-1 β (inyección C en las Figs. 19 y 20). Este incremento de unidades de respuesta indica que el IL-1 sRI se unía al complejo IL-1 β /AB7.

Este Ejemplo indica que el IL-1 sRI se une a IL-1 β pero no se une a AB7, y que el AB7 se une a un epítipo de IL-1 β de forma tal que el AB7 unido no impide sustancialmente que la IL-1 β se una a IL-1 sRI.

Todas las referencias, incluyendo publicaciones, solicitudes de patente y patentes, citadas en el presente documento se incorporan aquí por referencia en la misma extensión que si cada referencia se indicara individual y específicamente para incorporarse por referencia y se citara en su totalidad en el presente documento.

El uso de los vocablos "un" y "una" y "el" ("la") y de referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones siguientes) deberá interpretarse de manera que cubre tanto el

singular como el plural, a no ser que en la presente se indique lo contrario o que ello esté en clara contradicción con el contexto. Las expresiones "que comprende(n)", "que tiene(n)", "que incluye(n)" y "que contiene(n)" deberán interpretarse como expresiones abiertas (concretamente con el significado de "que incluye(n), aunque sin carácter limitativo"), a no ser que se indique lo contrario. Allí donde se use una expresión abierta para describir una característica o un elemento de la invención, se contempla específicamente que puede usarse una expresión cerrada en lugar de la expresión abierta sin desviarse del espíritu y del alcance de la invención. Las enumeraciones de intervalos de valores de la presente pretenden meramente servir de método abreviado para referirse individualmente a cada valor independiente que queda situado dentro del intervalo, a no ser que se indique aquí lo contrario, y cada valor independiente queda incorporado en la memoria descriptiva como si se enumerase aquí individualmente. Todos los métodos que aquí se describen pueden ejecutarse en cualquier orden adecuado a no ser que aquí se indique lo contrario o que ello esté de otro modo en clara contradicción con el contexto. El uso de cualesquiera y todos los ejemplos, o de lenguaje ejemplificativo (p. ej. "tal como") que se ofrece en la presente, está meramente destinado a aportar más luz a la invención y no establece limitación alguna sobre el alcance de la invención, a no ser que se reivindique lo contrario. Ninguna de las formas de expresión que se usan en la memoria descriptiva deberá ser interpretada como una indicación de que cualquier elemento no reivindicado sea esencial para la puesta en práctica de la invención.

Se describen aquí realizaciones preferidas de esta invención, incluyendo el mejor modo conocido para los inventores con el fin de llevar a cabo la invención. A aquellos profesionales en la materia podrán resultarles evidentes variaciones de esas realizaciones preferidas tras haber procedido a la lectura de la anterior descripción. Los inventores prevén que los profesionales expertos utilicen dichas variaciones según resulte apropiado, y los inventores tienen la intención de que la invención se lleve a la práctica de otras maneras distintas a las que aquí se describen específicamente. En consecuencia, esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia objeto de las reivindicaciones adjuntas a la presente, según lo permitido por la legislación aplicable. Además queda incluida en la invención cualquier combinación de los elementos anteriormente descritos en todas sus posibles variaciones, a no ser que aquí se indique lo contrario o que ello esté claramente en contradicción con el contexto.

Listado de secuencias

<110> XOMA Technology Ltd.

<120> ANTICUERPOS Y FRAGMENTOS DE LOS MISMOS DE UNIÓN A LA IL-1 β

<130> 17646WO02

<160> 57

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (7)..(7)

<223> "Xaa" es Thr o Ser

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (15)..(15)

<223> "Xaa" es Leu o Val

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (22)..(22)

<223> "Xaa" es Thr o Ser

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (41)..(41)

<223> "Xaa" es Asp o Gly

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 5 <222> (42)..(42)
 <223> "Xaa" es Gly o Lys

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 10 <222> (43)..(43)
 <223> "Xaa" es Thr o Ala

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 15 <222> (72)..(72)
 <223> "Xaa" es Thr o Ser

<400> 1

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

50 <210> 2
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Sintética

60 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (3)..(3)
 <223> "Xaa" es Thr o Gln

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

	<222> (5)..(5)
	<223> "Xaa" es Lys o Gln
5	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (11)..(11) <223> "Xaa" es Ile o Leu
10	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (12)..(12) <223> "Xaa" es Leu o Val
15	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (67)..(67) <223> "Xaa" es Thr o Ser
20	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (68)..(68) <223> "Xaa" es Gln o Arg
25	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (77)..(77) <223> "Xaa" es Arg o Lys
30	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (81)..(81) <223> "Xaa" es Phe o Ser
35	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (88)..(88) <223> "Xaa" es Asp o Thr
40	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (89)..(89) <223> "Xaa" es Thr o Ala
45	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (90)..(90) <223> "Xaa" es Val o Ala
50	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (94)..(94) <223> "Xaa" es Thr o Val
55	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (100)..(100) <223> "Xaa" es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn
60	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (101)..(101) <223> "Xaa" es Arg o Lys
65	<400> 2

ES 2 569 917 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60

Gln Val Xaa Leu Xaa Glu Ser Gly Pro Gly Xaa Xaa Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Xaa Xaa Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Xaa Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Xaa Leu Lys Ile Thr Ser Val Xaa Xaa Xaa Asp Thr Ala Xaa Tyr Phe
 85 90 95
 Cys Ala Arg Xaa Xaa Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sintética
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(1)
 <223> "Xaa" es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (2)..(2)
 <223> "Xaa" es Arg o Lys
 <400> 3
 Xaa Xaa Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sintética

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

35 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5

<211> 120

40 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

45

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

20 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

25 <210> 6
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Sintética
 <400> 6

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

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

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

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

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

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

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

70 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 7
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Sintética
 10
 <400> 7
 10
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 20
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 25
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 30
 Leu Lys Thr Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
 65 70 75 80
 35
 Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
 85 90 95
 40
 Cys Ala Arg Lys Lys Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
 100 105 110
 45
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 50
 <210> 8
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 8
 55
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

ES 2 569 917 T3

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 5
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 10
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 15
 Leu Lys Thr Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
 65 70 75 80
 20
 Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
 85 90 95
 25
 Cys Ala Arg Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
 100 105 110
 30
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 9
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> Sintética
 40
 <400> 9
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 45
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 50
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 55
 Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80

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

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

 15 <210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> Sintética

 <400> 10

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

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

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

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

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

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

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

 55 <210> 11
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sintética

 <400> 11

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

ES 2 569 917 T3

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 5
 Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 10
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Gln
 65 70 75 80
 15
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln Gly Lys Met Leu Pro Trp
 85 90 95
 20
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 12
 <211> 120
 <212> PRT
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sintética
 30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (100)..(100)
 <223> "Xaa" es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn
 35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (101)..(101)
 <223> "Xaa" es Arg o Lys
 40 <400> 12
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Leu Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 45
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 50
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 55
 60

ES 2 569 917 T3

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

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

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

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

15 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 13
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Sintética

25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (100)..(100)
 <223> "Xaa" es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn

30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (101)..(101)
 <223> "Xaa" es Arg o Lys

<400> 13

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

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

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

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

55

60

ES 2 569 917 T3

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 14
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 15
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

35 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16

<211> 10

40 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

45

<400> 16

50 Ala Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp
1 5 10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

55 <213> Artificial

<220>

<223> Sintética

60 <400> 17

Val Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp
1 5 10

5 <210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Sintética

<400> 18

15 Phe Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp
1 5 10

<210> 19
<211> 10
20 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintética
25 <400> 19

Lys Lys Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp
1 5 10

30 <210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Sintética

<400> 20

40 Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp
1 5 10

<210> 21
45 <211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
50 <223> Sintética

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (100)..(100)
55 <223> "Xaa" es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (101)..(101)
60 <223> "Xaa" es Arg o Lys

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

40 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

45 <210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> Sintética

55 <400> 22

60 Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp
1 5

50 <210> 23
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

55 <220>
<223> Sintética

60 <220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (100)..(100)
<223> "Xaa" es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (101)..(101)
 <223> "Xaa" es Arg o Lys

<400> 23

5

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

45

<210> 24
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

50

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (100)..(100)
 <223> "Xaa" es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn

55

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (101)..(101)
 <223> "Xaa" es Arg o Lys

60

<400> 24

ES 2 569 917 T3

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

35 <210> 25
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> Sintética

45 <400> 25

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

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

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

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

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

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

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

40 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

45 <210> 26
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Sintética

55 <400> 26

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

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

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

	Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Gly	Asp	Glu	Ser	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50					55						60				
5	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asn	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val
	65					70					75					80
10	Ser	Leu	Lys	Ile	Thr	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe
					85					90					95	
15	Cys	Ala	Arg	Asn	Arg	Tyr	Asp	Pro	Pro	Trp	Phe	Val	Asp	Trp	Gly	Gln
				100					105					110		
20	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
			115					120								
25	<210> 27 <211> 107 <212> PRT <213> Artificial															
30	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (7)..(7) <223> "Xaa" es Thr o Ser															
35	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (15)..(15) <223> "Xaa" es Leu o Val															
40	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (22)..(22) <223> "Xaa" es Thr o Ser															
45	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (41)..(41) <223> "Xaa" es Asp o Gly															
50	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (42)..(42) <223> "Xaa" es Gly o Lys															
55	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (43)..(43) <223> "Xaa" es Thr o Ala															

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (72)..(72)
 <223> "Xaa" es Thr o Ser
 5
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (77)..(77)
 <223> "Xaa" es Asn o Ser
 10
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (79)..(79)
 <223> "Xaa" es Glu o Gln
 15
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (83)..(83)
 <223> "Xaa" es Ile o Phe
 20
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (100)..(100)
 <223> "Xaa" es Gly o Gln
 25
 <400> 27

 Asp Ile Gln Met Thr Gln Xaa Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Xaa Gly
 1 5 10 15
 30
 Asp Arg Val Thr Ile Xaa Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 35
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Xaa Xaa Xaa Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 40
 Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 45
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Xaa Leu Thr Ile Ser Xaa Leu Xaa Gln
 65 70 75 80
 50
 Glu Asp Xaa Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln Gly Lys Met Leu Pro Trp
 85 90 95
 55
 Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 60
 <210> 28
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

	<220>
	<223> Sintética
5	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (3)..(3) <223> "Xaa" es Thr o Gln
10	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (5)..(5) <223> "Xaa" es Lys o Gln
15	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (11)..(11) <223> "Xaa" es Ile o Leu
20	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (12)..(12) <223> "Xaa" es Leu o Val
25	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (67)..(67) <223> "Xaa" es Thr o Ser
30	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (68)..(68) <223> "Xaa" es Gln o Arg
35	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (74)..(74) <223> "Xaa" es Asp o Asn
40	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (77)..(77) <223> "Xaa" es Arg o Lys
45	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (81)..(81) <223> "Xaa" es Phe o Ser
50	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (88)..(88) <223> "Xaa" es Asp o Thr
55	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (89)..(89) <223> "Xaa" es Thr o Ala

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (90)..(90)
 <223> "Xaa" es Val o Ala
 5
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (94)..(94)
 <223> "Xaa" es Thr o Val
 10
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (100)..(100)
 <223> "Xaa" es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn
 15
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (101)..(101)
 <223> "Xaa" es Arg o Lys
 20
 <400> 28

 Gln Val Xaa Leu Xaa Glu Ser Gly Pro Gly Xaa Xaa Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 25
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 35
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 40
 Leu Lys Xaa Xaa Leu Thr Ile Ser Lys Xaa Thr Ser Xaa Asn Gln Val
 65 70 75 80
 45
 Xaa Leu Lys Ile Thr Ser Val Xaa Xaa Xaa Asp Thr Ala Xaa Tyr Phe
 85 90 95
 50
 Cys Ala Arg Xaa Xaa Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
 100 105 110
 55
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 60
 <210> 29
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

	<220>
	<223> Sintética
5	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (3)..(3) <223> "Xaa" es Thr o Gln
10	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (5)..(5) <223> "Xaa" es Lys o Gln
15	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (11)..(11) <223> "Xaa" es Ile o Leu
20	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (12)..(12) <223> "Xaa" es Leu o Val
25	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (67)..(67) <223> "Xaa" es Thr o Ser
30	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (68)..(68) <223> "Xaa" es Gln o Arg
35	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (74)..(74) <223> "Xaa" es Asp o Asn
40	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (77)..(77) <223> "Xaa" es Arg o Lys
45	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (81)..(81) <223> "Xaa" es Phe o Ser
50	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (88)..(88) <223> "Xaa" es Asp o Thr
55	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (89)..(89) <223> "Xaa" es Thr o Ala

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (90)..(90)
 <223> "Xaa" es Val o Ala
 5
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (94)..(94)
 <223> "Xaa" es Thr o Val
 10
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (100)..(100)
 <223> "Xaa" es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn
 15
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (101)..(101)
 <223> "Xaa" es Arg o Lys, pero no es Lys si la posición (100) es Lys
 20
 <400> 29

 Gln Val Xaa Leu Xaa Glu Ser Gly Pro Gly Xaa Xaa Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 25
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 35
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 40
 Leu Lys Xaa Xaa Leu Thr Ile Ser Lys Xaa Thr Ser Xaa Asn Gln Val
 65 70 75 80
 45
 Xaa Leu Lys Ile Thr Ser Val Xaa Xaa Xaa Asp Thr Ala Xaa Tyr Phe
 85 90 95
 50
 Cys Ala Arg Xaa Xaa Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
 100 105 110
 55
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 60
 <210> 30
 <211> 10 115 120
 <212> PRT
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> Sintética

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(1)
 <223> "Xaa" es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn

 <220>
 5 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (2)..(2)
 <223> "Xaa" es Arg o Lys, pero no es Lys si la posición (1) es Lys

 <400> 30
 10

 Xaa Xaa Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp
 1 5 10

 <210> 31
 15 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> Sintética

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (100)..(100)
 25 <223> "Xaa" es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (101)..(101)
 30 <223> "Xaa" es Arg o Lys, pero no es Lys si la posición (100) es Lys

 <400> 31

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

 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 40

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

		35		40		45			
5		Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp
		50					55		60
10		Leu	Lys	Ser	Gln	Leu	Thr	Ile	Ser
		65				70			75
15		Ser	Leu	Lys	Ile	Thr	Ser	Val	Thr
					85				90
20		Cys	Ala	Arg	Xaa	Xaa	Tyr	Asp	Pro
					100				105
25		Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
				115					120

30 <210> 32
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Sintética

40 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (100)..(100)
 <223> "Xaa" es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn

45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (101)..(101)
 <223> "Xaa" es Arg o Lys, pero no es Lys si la posición (100) es Lys

<400> 32

ES 2 569 917 T3

1 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 5 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 10 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 15 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
 20 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 25 Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe
 30 Cys Ala Arg Xaa Xaa Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
 35 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 40 <210> 33
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial
 45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (100)..(100)
 <223> "Xaa" es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn
 50 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (101)..(101)
 <223> "Xaa" es Arg o Lys, pero no es Lys si la posición (100) es Lys
 55 <400> 33

ES 2 569 917 T3

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

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

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

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

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

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

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

40 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

45 <210> 34
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Sintética

55 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (100)..(100)
 <223> "Xaa" es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (101)..(101)
 <223> "Xaa" es Arg o Lys, pero no es Lys si la posición (100) es Lys

 <400> 34

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

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

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

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

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

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

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

 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

35 <210> 35
 <211> 120
 <212> PRT

40 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sintética

45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (100)..(100)
 <223> "Xaa" es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn

50 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (101)..(101)
 <223> "Xaa" es Arg o Lys, pero no es Lys si la posición (100) es Lys

55 <400> 35

ES 2 569 917 T3

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

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

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

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

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

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

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

 40 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

 45 <210> 36
 <211> 23
 <212> PRT 115 120
 <213> Homo Sapiens

 50 <400> 36

 Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys Met Glu Lys Arg
 1 5 10 15

 55 Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu
 20

 60 <210> 37
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia Enlazadora

 <400> 37

 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

 <210> 38
 <211> 360

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> Sintética
 <400> 38
 10 caagtacaac ttcaagaaag cgggccaggc cttgttaaac cctcccaaac tctttctctt
 60
 acctgttctt tctctggatt ctctctctct acctctggca tgggcgtcgg ctggatacgt
 120
 15 caaccaagtg gaaaaggact cgaatggctt gcacatatat ggtgggatgg cgacgaatct
 180
 20 tataaccctt ctcttaaate tcgacttaca atttctaaag acacttccaa aaaccaagtt
 240
 tccctcaaaa taacctccgt cactgctgca gatactgctg tctatTTTTg cgcacgaaac
 300
 25 agatatgata ccccttggtt cgttgattgg ggccaaggaa cactcgtaac cgtagctca
 360
 30 <210> 39
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Sintética
 <400> 39
 40 gacatccaaa tgactcaatc cacttcttca ctctcagcct ctgtcggaga ccgtgtaact
 60
 atcacctgcc gtgcttccca agacatctct aattatctct cctggatatca acaaaaacct
 120
 45 ggtaaagctg ttaaacttct catttattat acttctaaac ttcactccgg tgtgccttct
 180
 50 cgtttctcag gatcaggctc aggaaccgac tatacactca ccctctctc cctccaacaa
 240
 gaagacttcg ctacttactt ttgccttcaa ggaaaaatgc tcccctggac tttcggacaa
 300
 55 ggaacaaagc tcgaaattaa a
 321
 60 <210> 40
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 40

5

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

<210> Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 <211> 115 120
 <212>
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintética

45 <400> 41

ES 2 569 917 T3

[illegible]

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

35 <210> 43
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> Sintética

45 <400> 43

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

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

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

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

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

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

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

25 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 44
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Sintética

<400> 44

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

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

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

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

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

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

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

5 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 45
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Sintética

15 <400> 45

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

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

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

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

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

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

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

45 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 46
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintética

55 <400> 46

ES 2 569 917 T3

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

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

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

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

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

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

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

35 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210>
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> Sintética

45 <400> 47

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

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

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

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

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

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

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

15 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

20 <210> 48
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

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

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

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

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

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

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

60 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

60 <210> 49
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> Sintética

ES 2 569 917 T3

<400> 49

5	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln	1	5	10	15
10	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser	20	25	30	
15	Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu	35	40	45	
20	Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser	50	55	60	
25	Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val	65	70	75	80
30	Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe	85	90	95	
35	Cys Ala Arg Lys Lys Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln	100	105	110	
	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	115	120		

<210> 50

<211> 120

40 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

45

<400> 50

50	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Leu Lys Pro Ser Gln	1	5	10	15
	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser	20	25	30	

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

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

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

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

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

30 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 51
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintética

35 <400> 51

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

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

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

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

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

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

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

5 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 52
10 <211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
15 <223> Sintética
<400> 52

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

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

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

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

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

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

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

50 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 53
55 <211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
60 <223> Sintética

<400> 53

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

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

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

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

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

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

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

40 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 54

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 54

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

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

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

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

ES 2 569 917 T3

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

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

5

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

10

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15

<210> 55
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Sintética

<400> 55

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

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

60

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 56
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 56

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

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

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

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

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

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

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

35 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 57

40 <211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

45 <223> Sintética

<400> 57

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

ES 2 569 917 T3

	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser	
				20					25					30			
5	Gly	Met	Gly	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Ser	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	
			35					40					45				
10	Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Gly	Asp	Glu	Ser	Tyr	Asn	Pro	Ser	
		50					55					60					
15	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asn	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	
	65					70					75					80	
20	Ser	Leu	Lys	Ile	Thr	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	
					85					90					95		
25	Cys	Ala	Arg	Lys	Lys	Tyr	Asp	Pro	Pro	Trp	Phe	Val	Asp	Trp	Gly	Gln	
				100					105					110			
30	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115					120									

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo de unión a IL-1 β o fragmento del mismo de unión a IL-1 β , en el que el anticuerpo o fragmento se une a IL-1 β humana con una constante de disociación menor que 1pM y en el anticuerpo o fragmento se une a substancialmente el mismo epítoto que un anticuerpo que tiene la región variable de cadena ligera de ID SEC N°:11 y la región variable de cadena pesada de ID SEC N°:15 a la que se une.
- 10 2. Anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a un epítoto contenido en la secuencia ESDPKNYPKKKMEKRFVFNKIE (ID SEC N°: 36).
- 15 3. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo de neutralización.
- 20 4. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un Fab, un F(ab')₂, un Fv, un fragmento de anticuerpo de cadena única, un anticuerpo multiespecífico, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, un minicuerpo, un anticuerpo lineal, un anticuerpo recombinante quelante, un tricuerpo, un bicuerpo, un intracuerpo, un nanocuerpo, un pequeño producto inmunofarmacéutico modular (SMIP), una proteína de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión, un anticuerpo camelizado, un anticuerpo que contiene V_{HH}, o una variante o derivado de uno cualquiera de estos anticuerpos o fragmentos.
- 25 5. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo o fragmento comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 9, 10 u 11.
- 30 6. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo o fragmento comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 8, 12, 13, 14, 15, 23, 24, 25 o 26.
- 35 7. Ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 7.
9. Célula que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 7 o el vector de la reivindicación 8, en la que la célula no es una célula troncal embrionaria humana.
- 40 10. Composición que comprende (a) el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el ácido nucleico de la reivindicación 7, o el vector de la reivindicación 8, y (b) un vehículo adecuado.
11. Composición farmacéutica para ser usada en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o condición relacionada con las IL-1 en un mamífero, que comprende administrar una cantidad eficaz de (a) el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, (b) el ácido nucleico de la reivindicación 7, (c) el vector de la reivindicación 8, o (d) la composición de la reivindicación 10.

CADENA LIGERA

DIQMTQX1TSSLSASX2GDRVITIX1CRASQDISNYLSWYQQKXPX3X4X5VKLLIYYTSKLSHSGVPSRFSGSGSGTDYX1LTISNLEQEDIATYFC

CDR2

CDR1

LQGMPLPWTFGGGTKLEIK (ID SEC N°: 1)

CDR3

X1 es T o S; X2 es L o V; X3 es D o G; X4 es G o K; X5 es T o A;

CADENA PESADA

QVX10LX11ESGPGX12X13KPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGWIRQPSPGKGLEWLHIIWWDGDESYNPSLKX14X15LTISKDTSX16NQVX17LKI

CDR2

CDR1

TSVX18X19X20DTAX21YFCARX22X23YDPPWFVDWGQGLTVTVSS (ID SEC N°: 2)

CDR3

X10 es T o Q; X11 es K o Q; X12 es I o L; X13 es L o V; X14 es T o S; X15 es Q o R; X16 es R o K; X17 es F o S; X18 es D o T; X19 es T o A; X20 es V o A; X21 es T o V; X22 es A, V, F, K, o N; X23 es R o K

CADENA PESADA CDR3

X22X23YDPPWFVD (ID SEC N°: 3)

X22 es A, V, F, K, o N; X23 es R o K

Fig. 1

AB1

CADENA LIGERA
 DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLSWYQQKPDGTVKLLIYTSKLSHGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAITYFCLQGKMLPWTFGGG
 TKLEIK (ID SEC N°: 9)

CADENA PESADA
 QVTLKESGPGILKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDESYNPSLKTQLTISKDTSRNQVFLKITSVDTVDTATYFCARKA
 RYDPPWFVDWGQGLTVVSS (ID SEC N°: 4)

AB2

CADENA LIGERA
 DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLSWYQQKPDGTVKLLIYTSKLSHGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAITYFCLQGKMLPWTFGGG
 TKLEIK (ID SEC N°: 9)

CADENA PESADA
 QVTLKESGPGILKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDESYNPSLKTQLTISKDTSRNQVFLKITSVDTVDTATYFCARV
 RYDPPWFVDWGQGLTVVSS (ID SEC N°: 5)

AB3

CADENA LIGERA
 DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLSWYQQKPDGTVKLLIYTSKLSHGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAITYFCLQGKMLPWTFGGG
 TKLEIK (ID SEC N°: 9)

CADENA PESADA
 QVTLKESGPGILKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDESYNPSLKTQLTISKDTSRNQVFLKITSVDTVDTATYFCARE
 RYDPPWFVDWGQGLTVVSS (ID SEC N°: 6)

AB4

CADENA LIGERA
 DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLSWYQQKPDGTVKLLIYTSKLSHGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAITYFCLQGKMLPWTFGGG
 TKLEIK (ID SEC N°: 9)

CADENA PESADA
 QVTLKESGPGILKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDESYNPSLKTQLTISKDTSRNQVFLKITSVDTVDTATYFCARK
 KYDPPWFVDWGQGLTVVSS (ID SEC N°: 7)

Fig. 2

AB5

CADENA LIGERA

DIQMTQTSSLSASLGDRVTITCRASQDISNYLSWYQQKPGDGTVKLLIYTSKLSHSGVPSRFRSGSGGTDYSLTISNLEQEDIAITYFCLQGKMLPWTF
GGGTKLEIK (ID SEC N°: 9)

CADENA PESADA

QVTLKESGPGILKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAIHWWDGDESYNPSLKTQLTISKDTSRNQVFLKITSVDTVDTATYFC
ARNRYDPPWFVDWGQGTLVTVSS (ID SEC N°: 8)

AB5.1

CADENA LIGERA

DIQMTQSTSSLSASLGDRVTITCRASQDISNYLSWYQQKPGKTVKLLIYTSKLSHSGVPSRFRSGSGGTDYTLTISSLQQEDFATYFCLQGKMLPWTF
GGGTKLEIK (ID SEC N°: 10)

CADENA PESADA

QVQLQESGPGILLKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAIHWWDGDESYNPSLKSQTLISKDTSKNQVSLKITSVTAADTATYF
CARX1X2YDPPWFVDWGQGTLVTVSS (ID SEC N°: 12)

X1 es A, V, F, K, o N; X2 es R o K;

AB5.2

CADENA LIGERA

DIQMTQSTSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLSWYQQKPGKAVKLLIYTSKLSHSGVPSRFRSGSGGTDYTLTISSLQQEDFATYFCLQGKMLPWT
FGQGTKLEIK (ID SEC N°: 11)

CADENA PESADA

QVQLQESGPGILVKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAIHWWDGDESYNPSLKSRLTISKDTSKNQVSLKITSVTAADTAVYF
CARX1X2YDPPWFVDWGQGTLVTVSS (ID SEC N°: 13)

X1 es A, V, F, K, o N; X2 es R o K

Fig. 3

AB5.3

CADENA LIGERA
DIQMTQSTSSLSASLGDRVTITCRASQDISNYLSWYQQKPGKTVKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGGSGGTDYTLTISSLQQEDFATYFCLGKMLPWTFG
QGKLEIK (ID SEC N°: 10)

CADENA PESADA
QVQLQESGPGLLKPSQTLSTCSFGFSLSTSGMGVWIRQPSGKGLEWLAIHWWDGDESYNPSLKSQLTISKNTSKNQVSLKITSVTAADTATYFC
ARX1X2YDPPWFVDWGQGTLVTVSS (ID SEC N°: 23)

X1 es A, V, F, K, o N; X2 es R o K;

AB5.4

CADENA LIGERA
DIQMTQSTSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLSWYQQKPGKAVKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGGSGGTDYTLTISSLQQEDFATYFCLGKMLPWTF
QGKLEIK (ID SEC N°: 11)

CADENA PESADA
QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSFGFSLSTSGMGVWIRQPSGKGLEWLAIHWWDGDESYNPSLKSRLTISKNTSKNQVSLKITSVTAADTATYFC
ARX1X2YDPPWFVDWGQGTLVTVSS (ID SEC N°: 24)

X1 es A, V, F, K, o N; X2 es R o K

Fig. 4

AB6

CADENA LIGERA
DIQMTQSTSSLSASLGDRVTITCRASQDISNYLSWYQQKPGKTVKLLIYYTSKLSHSGVPSRFRSGSGSGTDYTLTISSLQQEDFATYFCLQGGKMLPWTF
GGGKLEIK (ID SEC N°: 10)

CADENA PESADA
QVQLQESGPGLLKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDESYPNPSLKSQLTISKDTSKNQVSLKITSVTAADTATYF
CARNRYDPPWFVFDWGGGTLTVSS (ID SEC N°: 14)

AB7

CADENA LIGERA
DIQMTQSTSSLSASVSGDRVTITCRASQDISNYLSWYQQKPGKAVKLLIYYTSKLSHSGVPSRFRSGSGSGTDYTLTISSLQQEDFATYFCLQGGKMLPWT
FGGKLEIK (ID SEC N°: 11)

CADENA PESADA
QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDESYPNPSLKSRLTISKDTSKNQVSLKITSVTAADTAVYF
CARNRYDPPWFVFDWGGGTLTVSS (ID SEC N°: 15)

Fig. 4A

AB8

CADENA LIGERA
 DIQMTQSTSSLSASLGDRVTITCRASQDISNYLSWYQQKPGKTVKLLIYYTSKLSHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQQEDFATYFCLOGKMLPWT
 GQGTKLEIK (ID SEC N°: 10)

CADENA PESADA
 QVQLQESGPGLLKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDESYNPSLKSQLTISKNTSKNQVSLKITSVTAADTATYF
 CARNRYDPPWFVDWGGTTLVTSS (ID SEC N°: 25)

AB9

CADENA LIGERA
 DIQMTQSTSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLSWYQQKPGKAVKLLIYYTSKLSHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQQEDFATYFCLOGKMLPWT
 FGQGTKLEIK (ID SEC N°: 11)

CADENA PESADA
 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDESYNPSLKSRLTISKNTSKNQVSLKITSVTAADTAVYF
 CARNRYDPPWFVDWGGTTLVTSS (ID SEC N°: 26)

Fig. 4B

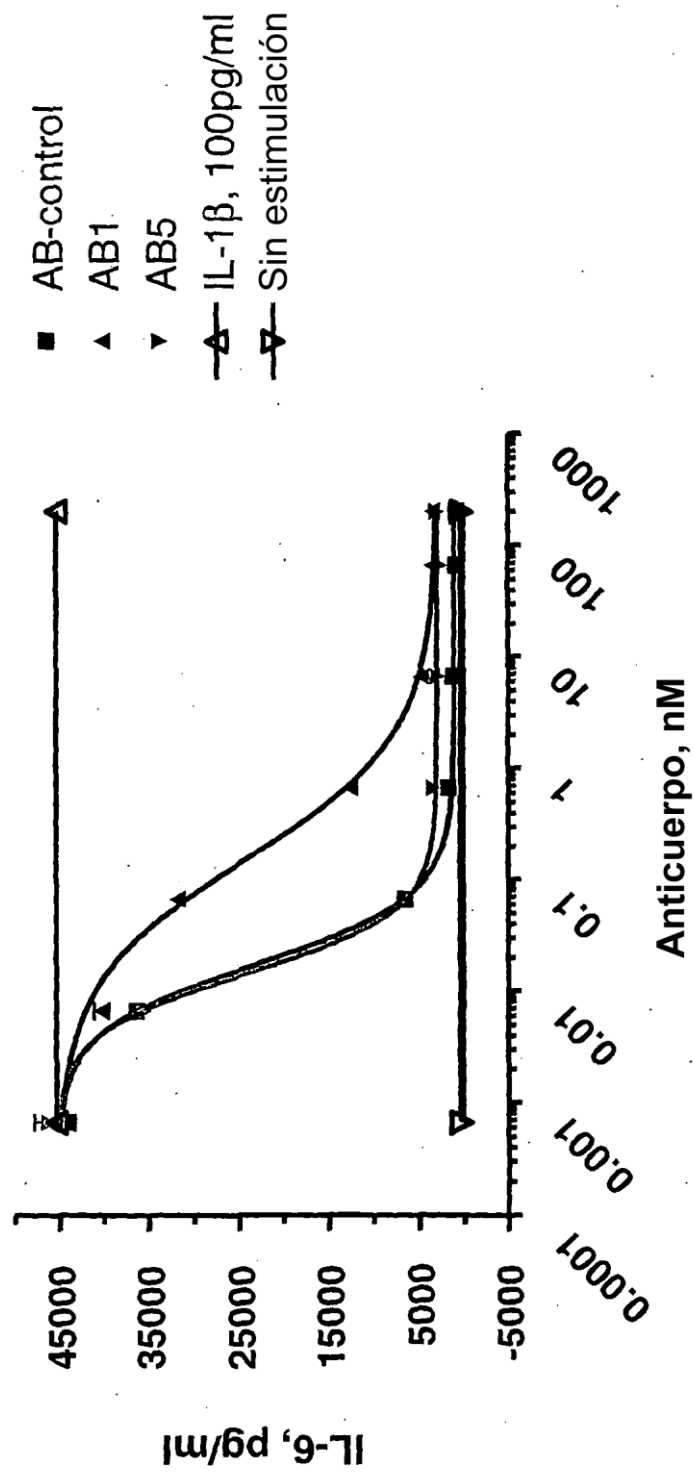


Fig. 5

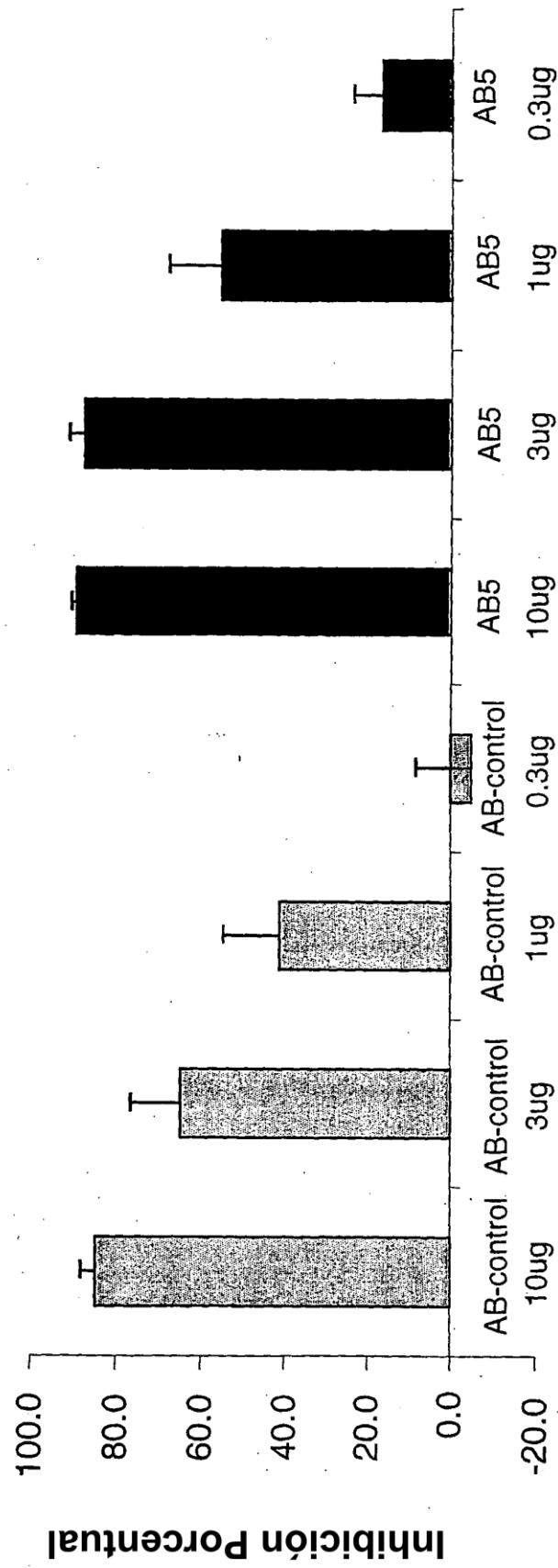


Fig. 6

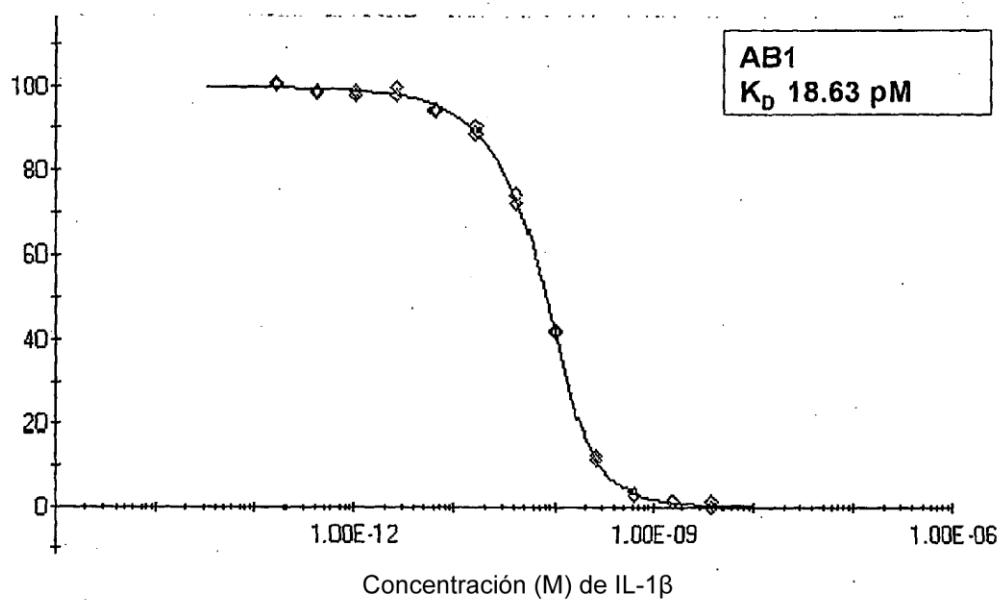


Fig. 7

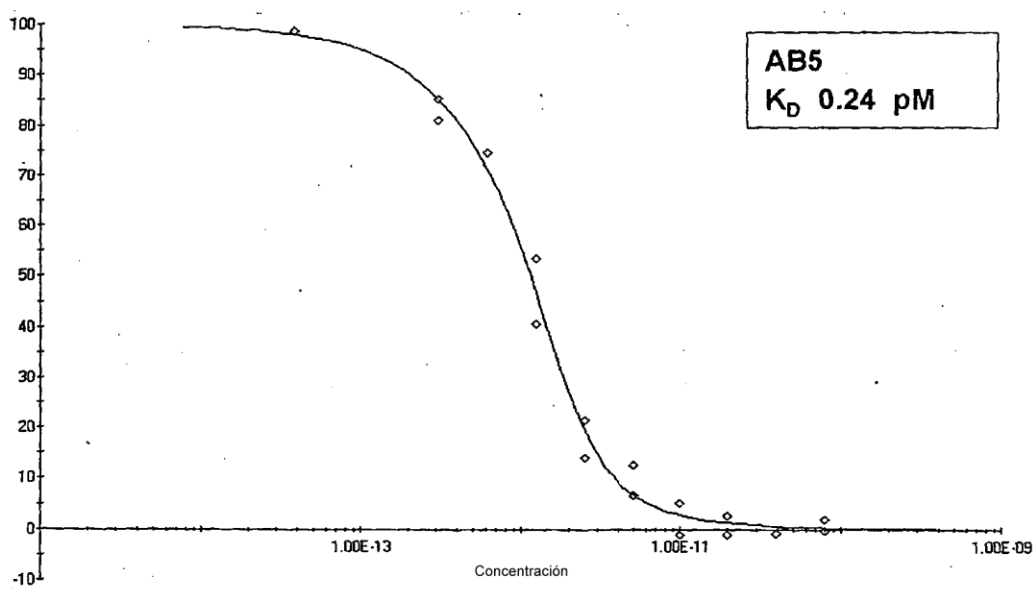


Fig. 8

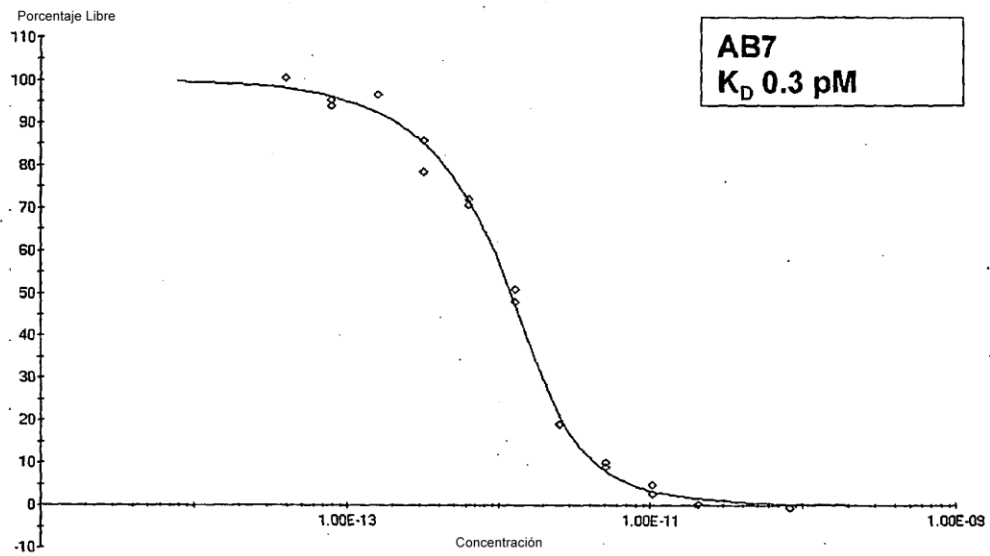


Fig. 9

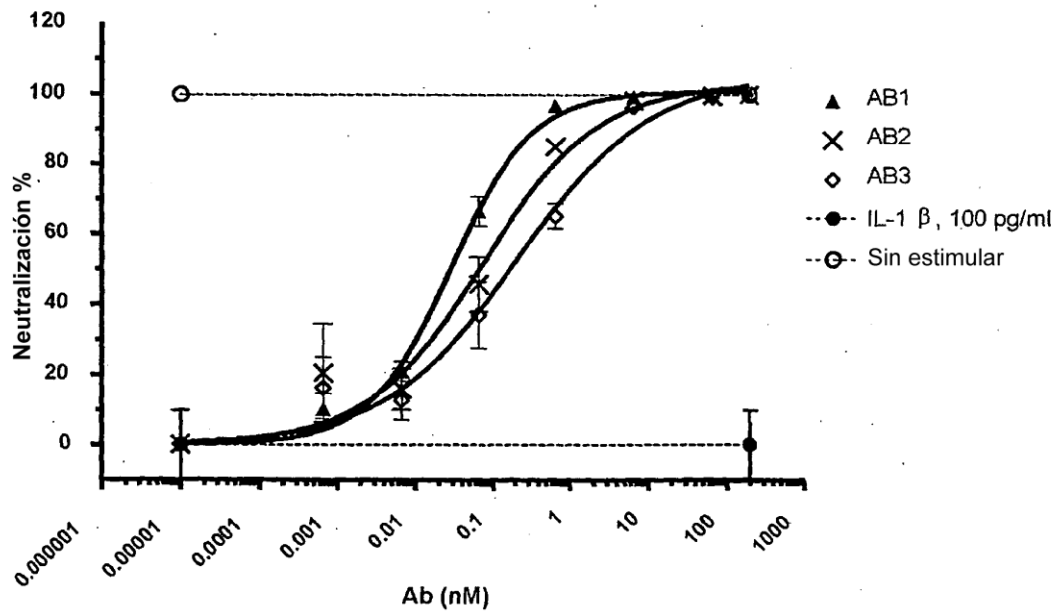


Fig. 10

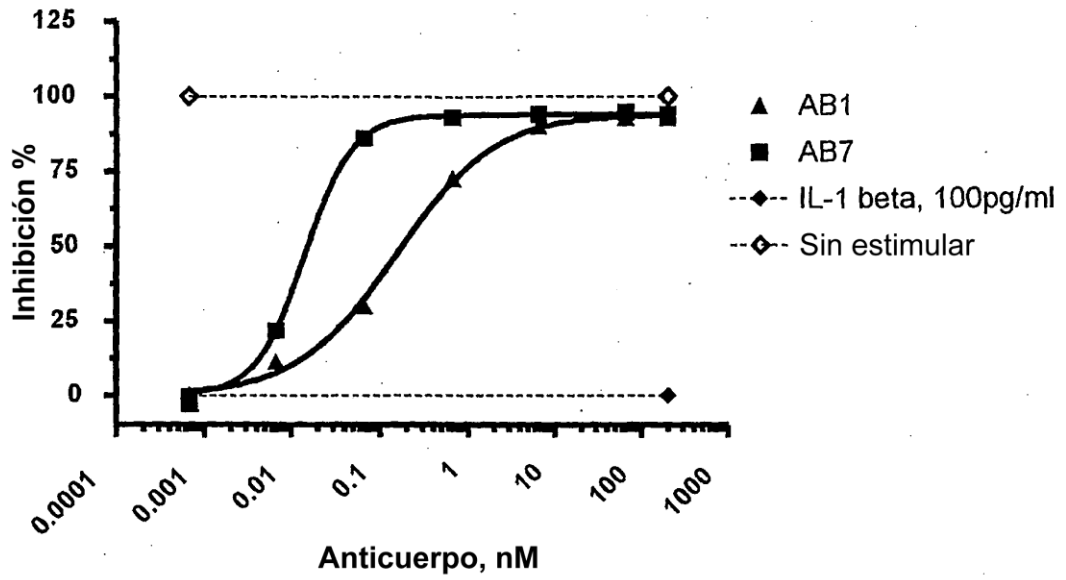


Fig. 11

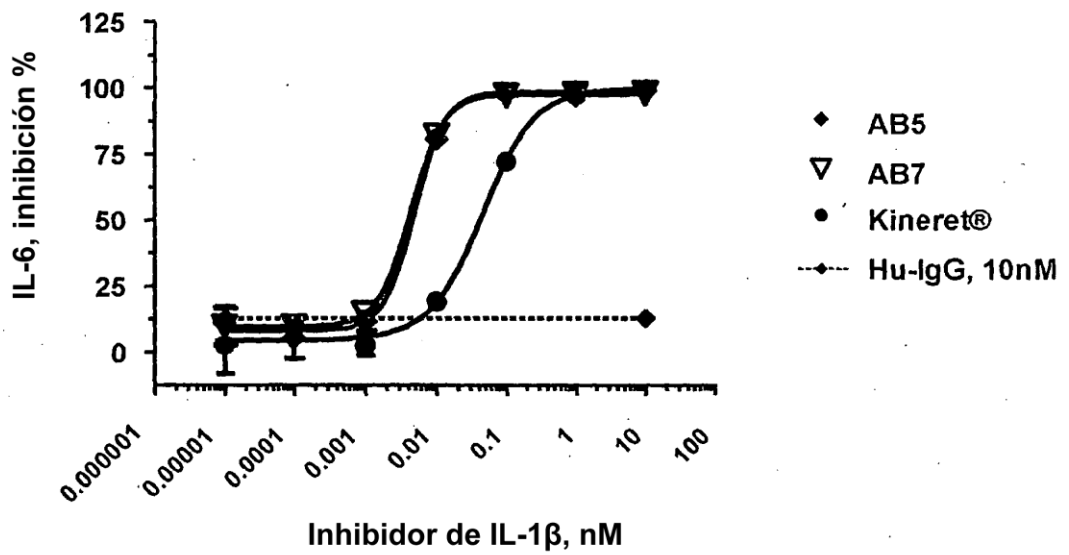


Fig. 12

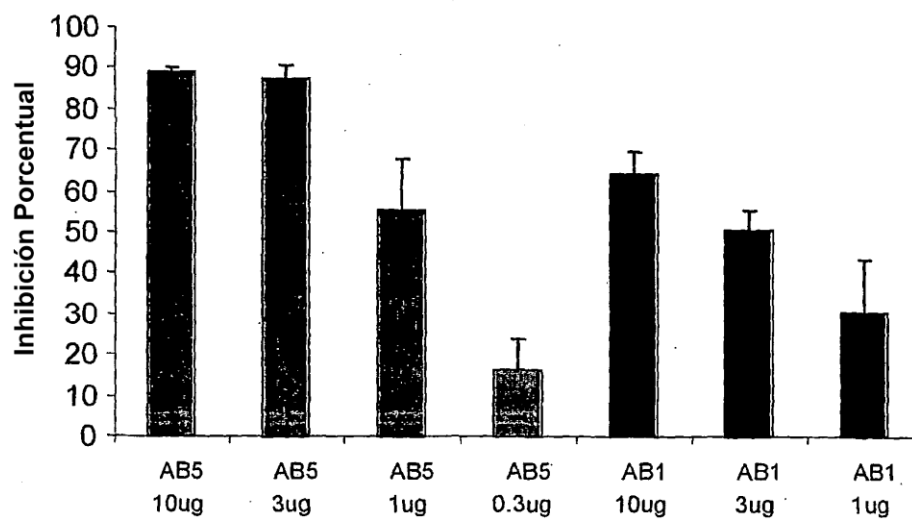


Fig. 13

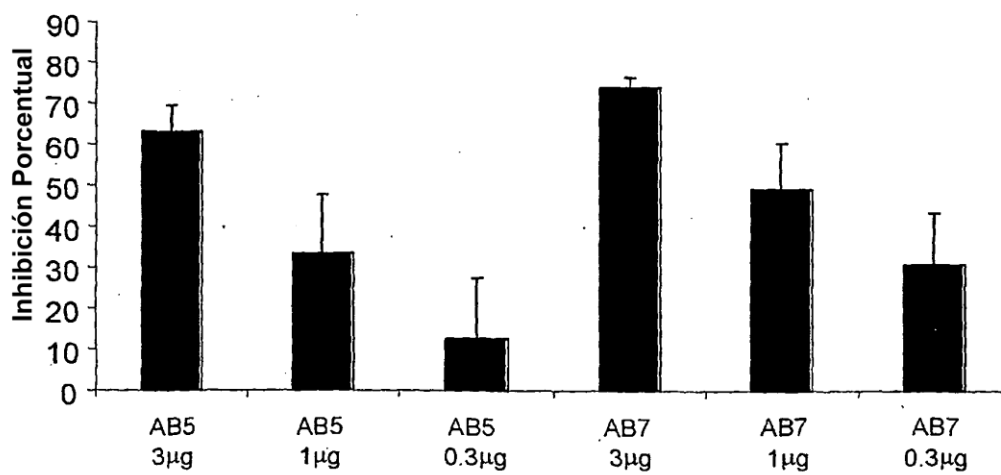


Fig. 14

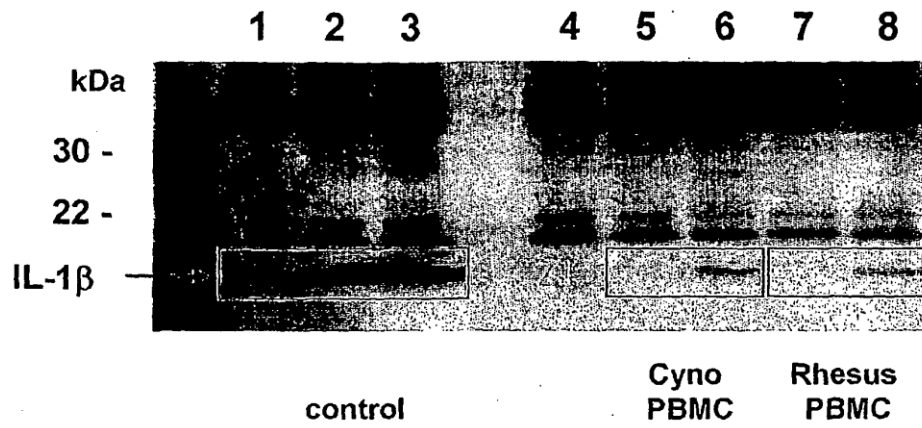


Fig. 15

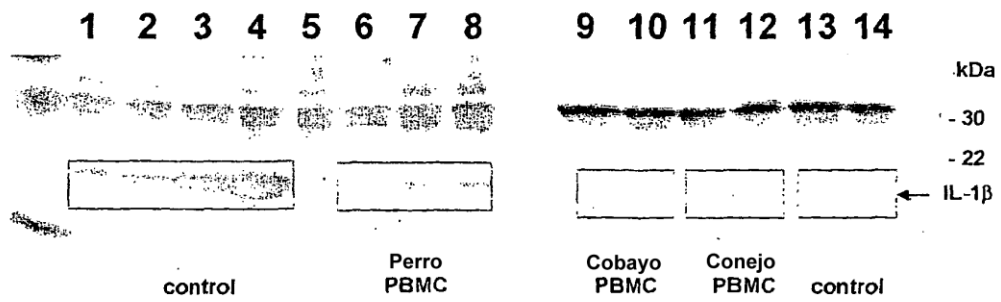


Fig. 16

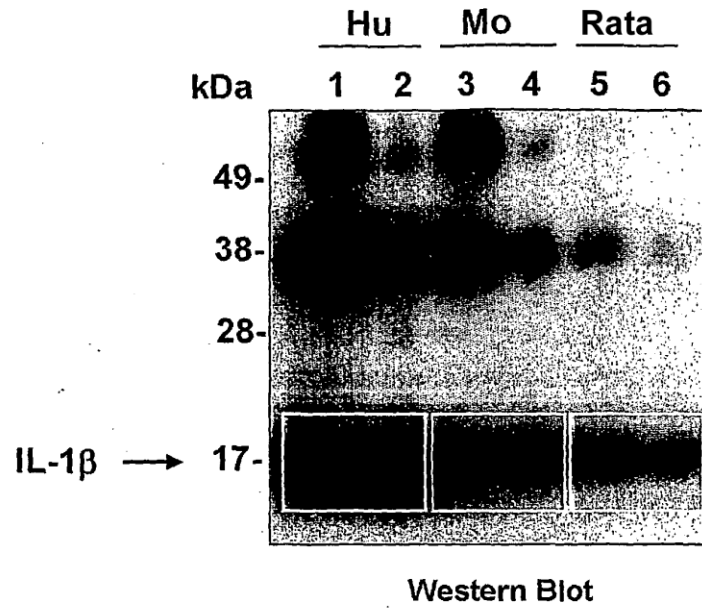


Fig. 17

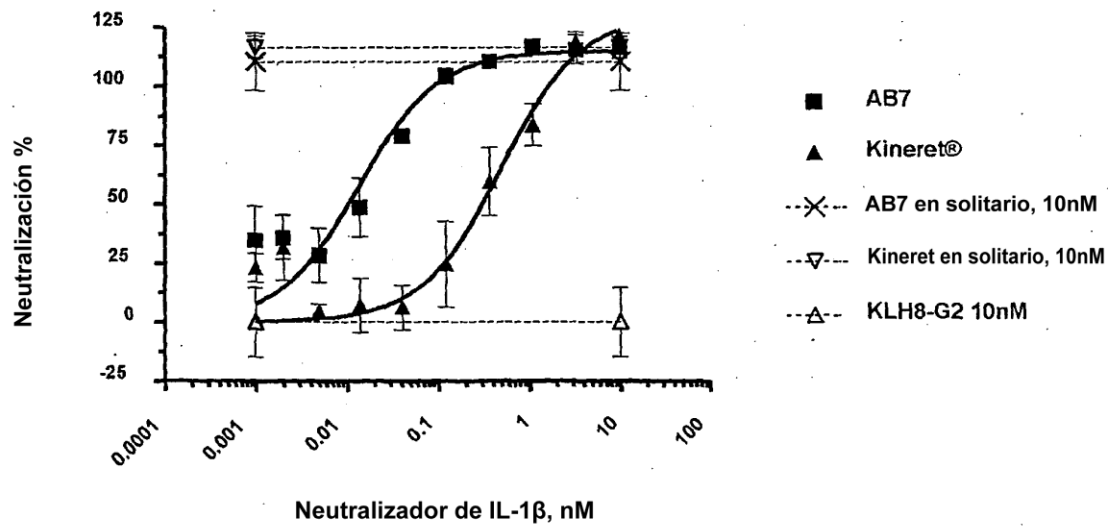


Fig. 18

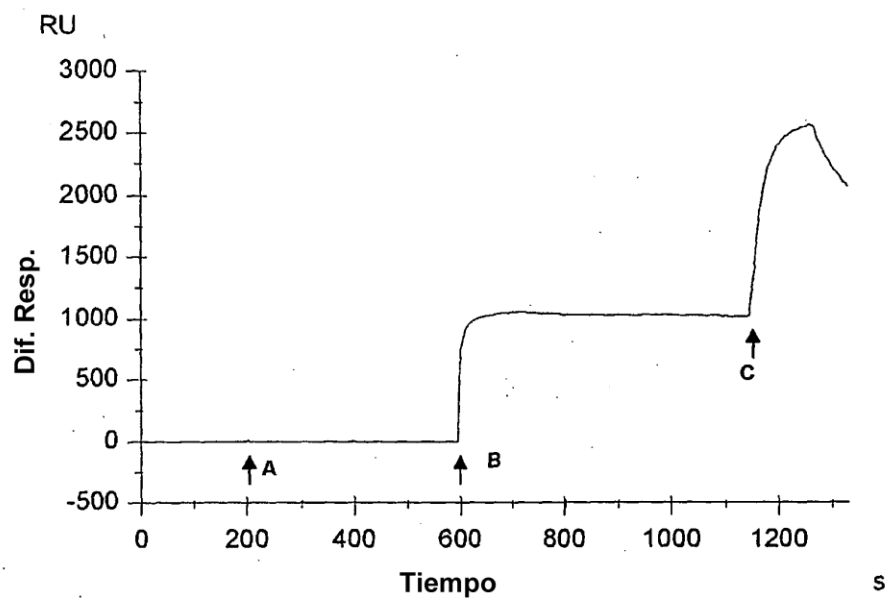


Fig. 19

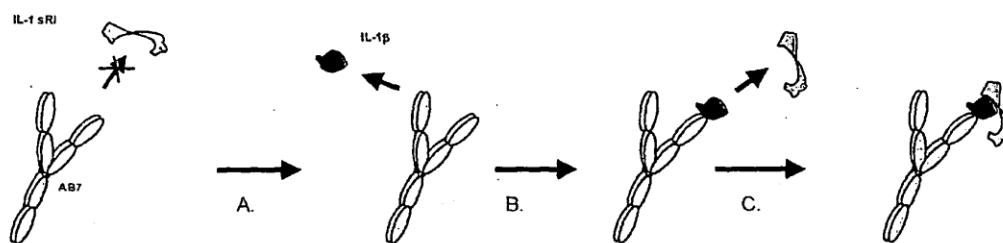


Fig. 20