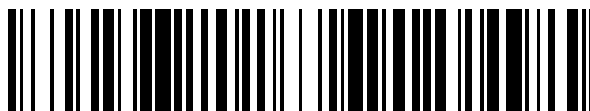


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 681**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 5/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2009** **E 09758739 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016** **EP 2285409**

54 Título: **Anticuerpos IL-1 alfa**

30 Prioridad:

30.05.2008 US 57586 P

14.05.2009 US 178350 P

10.12.2008 US 121391 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.07.2016

73 Titular/es:

XBIOTECH, INC (100.0%)
1055 West Hastings Street, Suite 300
Vancouver, British Columbia V6E 2E9, CA

72 Inventor/es:

SIMARD, JOHN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 576 681 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 IL-1 alfa

5 Campo de la invención

La invención se refiere en general a los campos de inmunología, inflamación, cáncer, trastornos vasculares, y medicina. Más particularmente, la invención se refiere a anticuerpos (Acs) que se unen específicamente a interleucina-1 α (IL-1 α) y métodos de uso de dichos Acs para tratar, prevenir, o detectar una patología asociada con la expresión anormal de IL-1 α .

Antecedentes

15 IL-1 α es una citoquina proinflamatoria que desempeña un papel en una serie de actividades diferentes, incluyendo inflamación, respuestas inmunitarias, metástasis tumoral, y hematopoyesis. Los autoanticuerpos IgG contra IL-1 α están presentes de forma natural en la población humana general y se cree que son beneficiosos en enfermedades, tales como aterosclerosis.

20 Miossec (*Ann. Rheum. Dis.* (2002) 61:577-579) describe el uso de anticuerpos anti-IL-1 α como tratamiento natural para la artritis reumatoide.

25 Jefferis (*Expert Opin. Biol. Ther.* (2007) 7(9): 1401-1413) desvela la selección del isotipo rMAb y su importancia en la determinación de las actividades biológicas que se desencadenan *in vivo*. Salfeld también desvela la importancia de la selección del isotipo cuando se conciben anticuerpos para aplicaciones terapéuticas. (*Nature Biotechnology* (2007) 25(12): 1369-72).

Sumario

30 La invención se basa en el desarrollo de Acs monoclonales (AMs) completamente humanos que incluyen (i) una región variable de unión al antígeno que exhibe una afinidad de unión muy alta para IL-1 α humana y (ii) una región constante que es eficaz tanto en la activación del sistema del complemento por la unión a C1q como la unión a varios receptores Fc diferentes. Los AMs específicos para IL-1 α descritos en el presente documento se realizaron mediante la sustitución de la región constante de un AcM IgG4 humano con una región variable específica para IL-1 α humana con la región constante de un AcM IgG1 humano.

35 Por consiguiente, la invención presenta un AcM IgG1 humano purificado que se une específicamente a IL-1 α humana, el AcM incluye una cadena pesada covalentemente unida a una cadena ligera. La cadena pesada puede incluir la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y la cadena ligera puede incluir la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

40 Asimismo, en la invención se encuentra un conjunto de ácidos nucleicos aislados que comprende un primer ácido nucleico codificante de la cadena pesada de un AcM IgG1 humano que se une específicamente a IL-1 α , y un segundo ácido nucleico codificante de la cadena ligera del AcM IgG1 humano que se une específicamente a IL-1 α humana. El primer ácido nucleico puede codificar la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y el segundo ácido nucleico puede codificar la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. El primer ácido nucleico puede incluir la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 10 y el segundo ácido nucleico puede incluir la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 12.

50 En otro aspecto, la invención presenta un vector de expresión que incluye un ácido nucleico codificante de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 11.

Otra característica de la invención es una célula hospedadora aislada (p. ej., una célula de mamífero, tal como una célula CHO), incluyendo el conjunto de ácidos nucleicos aislados que comprenden un primer ácido nucleico codificante de la cadena pesada de un AcM IgG1 humano que se une específicamente a IL-1 α , y un segundo ácido nucleico codificante de la cadena ligera del AcM IgG1 humano que se une específicamente a IL-1 α humana. La cadena pesada puede incluir la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera puede incluir la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

60 La divulgación describe además un método para destruir una célula que expresa IL-1 α humana. Este método puede incluir la etapa de poner en contacto la célula con un AcM IgG1 humano purificado que se une específicamente a IL-1 α .

65 Se describe igualmente un método de inhibición de la migración de una célula humana a través de una matriz de la membrana basal. Este método puede incluir la etapa de adición de un AcM purificado que se une específicamente a IL-1 α humana a una mezcla que incluye una matriz de la membrana basal y la célula humana.

También se describe un método de inhibición de un aumento inducido por IL-1 α en la expresión de ICAM-1 y/o E-selectina en la superficie de una célula endotelial humana. Este método puede incluir la etapa de adición de un AcM purificado que se une específicamente a IL-1 α humana a una mezcla que incluye la célula endotelial e IL-1 α .

La divulgación describe de manera adicional un método de seguimiento de la inflamación en un sujeto humano sometido previamente a las etapas de: obtener del sujeto una primera muestra de células mononucleares de sangre periférica en un primer momento; poner en contacto la primera muestra con un AcM purificado que se une específicamente a IL-1 α humana; y determinar el porcentaje de células de la primera muestra que se unen al Ac monoclonal. Este método puede incluir las etapas de: (a) obtener del sujeto una segunda muestra de células mononucleares de sangre periférica en un segundo momento; (b) poner en contacto la segunda muestra con el AcM purificado que se une específicamente a IL-1 α humana; (c) determinar el porcentaje de células de la segunda muestra que se unen al Ac monoclonal; y (d) comparar el porcentaje de células de la primera muestra que se unen al AcM con respecto al porcentaje de células de la segunda muestra que se unen al Ac monoclonal.

En los métodos previos, el AcM purificado es un AcM IgG1 humano que incluye una cadena pesada covalentemente unida a una cadena ligera, p. ej., en la que la cadena pesada incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y la cadena ligera incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

Otro método descrito presenta las etapas de: (a) enriquecer una muestra biológica obtenida de un sujeto humano empleando un filtro para separar las moléculas según el peso molecular en una primera fracción que incluye IgG intacta complejada con IL-1 α y una segunda fracción que comprende moléculas inferiores a 100 kDa; y (b) cuantificar la cantidad de IL-1 α en la primera fracción.

Otro método descrito presenta las etapas de: (a) enriquecer una muestra de plasma obtenida de un sujeto humano empleando un filtro que separa las moléculas según el peso molecular en una primera fracción que incluye IgG intacta complejada con IL-1 α y una segunda fracción que comprende moléculas inferiores a 100 kDa; (b) añadir la primera fracción a un sustrato que incluye Acs anti-IgG humana inmovilizados en condiciones que permiten que la IgG de la primera fracción se una específicamente a los Acs anti-IgG humana inmovilizados en el sustrato; (c) lavar el sustrato para eliminar el material de la primera fracción que no se une específicamente a los Acs anti-IgG humana inmovilizados; (d) poner en contacto el sustrato lavado en la etapa (c) con un Ac que se une específicamente a IL-1 α humana en condiciones que permiten que el Ab que se une de manera específica a IL-1 α humana se una específicamente a cualquier IL-1 α humana unida al sustrato; (e) lavar el sustrato para eliminar cualquier Ac que se une específicamente a IL-1 α humana que no se une al sustrato; y (f) cuantificar la cantidad de Ac que se une específicamente a IL-1 α humana restante unida al sustrato tras la etapa (e).

A menos que se especifique lo contrario, todos los términos técnicos utilizados en el presente documento poseen el mismo significado que el entendido habitualmente por el experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Las definiciones entendidas comúnmente de los términos biológicos pueden hallarse en Rieger *et al.*, *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5ª edición, Springer-Verlag: Nueva York, 1991; y Lewin, *Genes V*, Oxford University Press: Nueva York, 1994.

El término "se une específicamente", como se emplea en el presente documento, cuando hace referencia a un polipéptido (incluyendo Acs) o receptor, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína o polipéptido o receptor en una población heterogénea de proteínas y otros biológicos. Por consecuencia, en condiciones designadas (p. ej., condiciones de inmunoensayo en el caso de un Ac), el ligando o Ac especificado se une a su "diana" particular y no se une en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra o a otras proteínas a las que el ligando o Ac puede ponerse en contacto en un organismo. Generalmente, una primera molécula que "se une específicamente" a una segunda molécula posee una constante de afinidad de equilibrio superior aproximadamente a 10^5 (p. ej., 106, 107, 108, 109, 10^{10} , 10^{11} y 10^{12} o más) litros/mol a la segunda molécula.

Cuando se hace referencia a una molécula proteica, tal como un Ac, "purificado" significa separado de componentes que acompañan naturalmente a dichas moléculas. Normalmente, un Ac o proteína se purifica cuando representa al menos aproximadamente 10 % (p. ej., 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,9 % y 100 %), en peso, libre de las proteínas sin Ac u otras moléculas orgánicas presentes de forma natural con las que se asocia naturalmente. La pureza puede medirse por cualquier método apropiado, p. ej., cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida, o análisis por HPLC. Se "purifica" una proteína químicamente sintetizada u otra proteína recombinante producida en un tipo celular diferente al tipo celular en la que está presente de forma natural.

Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento pueden emplearse en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales apropiados. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones, se controlará. Además, las realizaciones particulares discutidas a continuación son meramente ilustrativas y no tienen por objeto ser limitantes.

Descripción detallada

La invención abarca composiciones y métodos relacionados con AMs completamente humanos que incluyen (i) una región variable de unión a antígeno que exhibe afinidad de unión muy alta para IL-1 α y (ii) una región constante que es eficaz tanto en la activación del sistema del complemento por la unión a C1q como la unión a varios receptores Fc diferentes. La cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. Las realizaciones preferentes descritas a continuación ilustran la adaptación de estas composiciones y métodos. No obstante, a partir de la descripción de estas realizaciones, pueden realizarse y/o practicar otros aspectos de la invención en base a la descripción proporcionada a continuación.

Los métodos que implican técnicas biológicas inmunológicas y moleculares convencionales se describen en el presente documento. Los métodos inmunológicos (por ejemplo, ensayos de detección y localización de complejos antígeno-Ac, inmunoprecipitación, inmunoelectrotransferencia, y similares) se conocen generalmente en la materia y se describen en tratados de metodología, tales como *Current Protocols in Immunology*, Coligan *et al.*, ed., John Wiley & Sons, Nueva York. Las técnicas de biología molecular se describen con detalle en tratados, tales como *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., vol. 1-3, Sambrook *et al.*, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 2001; y *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.*, ed., Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York. Se describen métodos de Ac en *Handbook of Therapeutic Abs*, Dubel, S., ed., Wiley-VCH, 2007. Las técnicas de cultivo celular se conocen generalmente en la materia y se describen con detalle en tratados de metodología, tales como *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 4ª edición, de R Ian Freshney, Wiley-Liss, Hoboken, N.J., 2000; y *General Techniques of Cell Culture*, de Maureen A Harrison e Ian F Rae, Cambridge University Press, Cambridge, R. U., 1994. Los métodos de purificación proteica se discuten en *Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology*, vol. 182, Deutscher M P, ed., Academic Press, San Diego, Calif., 1990.

En un aspecto, la invención presenta un AcM completamente humano que incluye (i) una región variable de unión al antígeno que exhibe afinidad de unión muy alta para IL-1 α humana y (ii) una región constante que es eficaz tanto en la activación del sistema del complemento por la unión a C1q como la unión a varios receptores Fc diferentes. La cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. El Ac humano es preferentemente una IgG1. La K_a del Ac es preferentemente al menos $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ o superior (p. ej., superior a $9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $8 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $7 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, o $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$).

Puesto que los linfocitos B que expresan Ig específica para IL-1 α humana están presentes naturalmente en los seres humanos, un método actualmente preferente para aumentar AMs es aislar en primer lugar dicho linfocito B de un sujeto y luego immortalizarlo de modo que se pueda replicar de forma continua en un cultivo. Los sujetos que carecen de un gran número de linfocitos B presentes de forma natural que expresan Ig específica para IL-1 α humana pueden inmunizarse con uno o más antígenos IL-1 α humana para aumentar la cantidad de dichos linfocitos B. AMs humanos se preparan immortalizando una célula que secreta Ac humano (p. ej., una célula de plasma humano). Véase, p. ej., la patente de Estados Unidos n.º 4.634.664.

En un método a modo de ejemplo, uno o más (p. ej., 5, 10, 25, 50, 100, 1.000, o más) sujetos humanos (p. ej., sujetos a los que no se le ha administrado previamente una vacuna de IL-1 α humana) se exploran para la presencia de dicho Ac específico para IL-1 α humana en su sangre. Los sujetos que expresan el Ac deseado pueden utilizarse como donantes de linfocitos B. En un posible método, la sangre periférica se obtiene de un donante humano que posee linfocitos B que expresan Ac específico para IL-1 α humana. Dichos linfocitos B se aíslan entonces de la muestra sanguínea, p. ej., por clasificación celular (p. ej., clasificación celular activada por fluorescencia, "CCAF"; o clasificación celular por microesferas magnéticas) para seleccionar linfocitos B que expresan Ig específica para IL-1 α humana. Estas células pueden immortalizarse por transformación viral (p. ej., empleando VEB) o por fusión a otra célula immortalizada, tal como un mieloma humano según técnicas conocidas. Los linfocitos B en esta población que expresan Ig específica para IL-1 α humana pueden aislarse por métodos limitantes de dilución (p. ej., pueden seleccionarse y subcultivarse células en pocillos de una placa de microtitulación que son positivas para Ig específica para IL-1 α humana, y el proceso se repitió hasta poder aislar una línea clonal deseada). Véase, p. ej., Goding, *Monoclonal Abs: Principles and Practice*, págs. 59-103, Academic Press, 1986. Resultan preferentes esas líneas celulares clonales que expresan Ig con al menos afinidades nanomolar o picomolar de unión para IL-1 α humana. Los AMs secretados por estas líneas celulares clonales pueden purificarse del medio de cultivo o de un fluido corporal (p. ej., ascitis) por medio de procedimientos convencionales de purificación de Ig, tales como cortes de sal, exclusión por tamaños, separación por intercambio iónico, y cromatografía de afinidad.

Aunque los linfocitos B immortalizados pueden utilizarse en cultivos *in vitro* para producir directamente AMs, en algunos casos, podría ser deseable emplear sistemas de expresión heterólogos para producir AMs. Véase, p. ej., los métodos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos número 11/754.899. Por ejemplo, los genes codificantes de un AcM específico para IL-1 α humana podrían clonarse e introducirse en un vector de expresión (p. ej., un vector de expresión basado en plásmidos) para la expresión en una célula hospedadora heteróloga (p. ej., células CHO, células COS, células de mieloma, y células de *E. coli*). Ya que las Igs incluyen cadenas pesadas (P) y

ligeras (L) en una configuración H_2L_2 , los genes codificantes de cada una de estas pueden aislarse y expresarse por separado en diferentes vectores.

Aunque generalmente menos preferentes, los AMs quiméricos (p. ej., AMs "humanizados"), que son moléculas de unión a antígeno con diferentes partes obtenidas a partir de diferentes especies animales (p. ej., región variable de una Ig de ratón fusionada a la región constante de una Ig humana), podrían utilizarse en la invención. Dichos Acs quiméricos puede prepararse por métodos conocidos en la materia. E. G., Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 81:6851, 1984; Neuberger *et al.*, *Nature*, 312:604, 1984; Takeda *et al.*, *Nature*, 314:452, 1984. De manera similar, los Acs pueden humanizarse por métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, los Acs monoclonales con una especificidad de unión deseada pueden ser comercialmente humanizados o como se describe en las patentes de Estados Unidos n.º 5.693.762; 5.530.101; o 5.585.089.

Los AMs descritos en el presente documento podrían madurarse por afinidad para potenciar o de otra forma modificar su especificidad de unión por métodos conocidos, tales como transposiciones del dominio VH y VL (Marks *et al. Bio/Technology* 10:779-783, 1992), mutagénesis aleatoria de las regiones hipervariables (RHVs) y/o residuos variables (Barbas *et al. Proc Nat. Acad. Sci. EE. UU.* 91:3809-3813, 1994; Schier *et al. Gene* 169:147-155, 1995; Yelton *et al. J. Immunol.* 155:1994-2004, 1995; Jackson *et al., J. Immunol.* 154(7):3310-9, 1995; y Hawkins *et al, J. Mol. Biol.* 226:889-896, 1992. Las variantes de la secuencia de aminoácidos de un Ac pueden prepararse mediante la introducción de cambios apropiados en la secuencia de nucleótidos codificante del Ac. Además, podrían alterarse las modificaciones en las secuencias del ácido nucleico codificantes de AMs (p. ej., sin cambiar la secuencia de aminoácidos del AcM) para potenciar la producción del AcM en ciertos sistemas de expresión (p. ej., eliminación de intrones y/u optimización de codones para un sistema de expresión dado). Los AMs descritos en el presente documento pueden modificarse asimismo por conjugación a otra proteína (p. ej., otro AcM) o molécula no proteica. Por ejemplo, un AcM podría conjugarse a un polímero soluble en agua, tal como polietilenglicol o un nanotubo de carbono (Véase, p. ej., Kam *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 102:11600-11605, 2005). Véase, la solicitud de la patente de Estados Unidos n.º 11/754.899 (publicación n.º US2008/0050310).

Preferentemente, para garantizar que los elevados títulos de AcM específico para IL-1 α humana puedan administrarse a un sujeto con efectos adversos mínimos, las composiciones de AcM de la invención representan al menos 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,9 o más por ciento en peso puro (excluyendo cualquier excipiente). Las composiciones de AcM de la invención pueden incluir solamente un tipo único de AcM (es decir, uno producido a partir de una única línea clonal de linfocitos B) o pueden incluir una mezcla de dos o más (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) tipos diferentes de AMs. Además de AMs IL-1 α humana, las composiciones de Ac de la invención también pueden incluir otros AMs que se unen específicamente a antígenos distintos a IL-1 α humana.

Para modificar o potenciar su función, los AcM IL-1 α humana pueden conjugarse a otra molécula, tal como una citotoxina o marcador detectable. Un AcM específico para IL-1 α humana podría conjugarse con una o más citotoxinas para destruir de manera más eficaz las células que expresan IL-1 α . Las citotoxinas para su uso en la invención pueden ser cualquier agente citotóxico (p. ej., molécula que puede destruir una célula tras ponerse en contacto con la célula) que puede conjugarse con un AcM específico para IL-1 α humana. Ejemplos de citotoxinas incluyen, entre otros, radionúclidos (p. ej., ^{35}S , ^{14}C , ^{32}P , ^{125}I , ^{131}I , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{201}Tl , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{57}Cu , ^{213}Bi , y ^{211}At), radionúclidos conjugados, y agentes quimioterapéuticos. Otros ejemplos de citotoxinas incluyen, entre otros, antimetabolitos (p. ej., 5-fluorouracilo (5-FU), metotrexato (MTX), fludarabina, etc.), agentes antimitóticos (p. ej., vincristina, vinblastina, colchicina, taxanos (tales como paclitaxel y docetaxel), etc.), agentes alquilantes (p. ej., ciclofosfamida, melfalán, biscloroetilnitrosurea (BCNU), etc.), agentes de platino (p. ej., cisplatino (también denominado cDDP), carboplatino, oxaliplatino, JM-216, CI-973, etc.), antraciclinas (p. ej., doxorubicina, daunorubicina, etc.), agentes antibióticos (p. ej., mitomicina C), inhibidores de la topoisomerasa (p. ej., etopósido, tenopósido, y camptotecinas) u otros agentes citotóxicos, tales como ricina, toxina diftérica (TD), exotoxina de pseudomonas (EP) A, PE40, abrina, saporina, proteína viral de la hierba de carmín, bromuro de etidio, glucocorticoides, toxina del ántrax y otros. Véase, p. ej., la patente de Estados Unidos n.º 5.932.188.

El AcM específico para IL-1 α humana también puede conjugarse a un marcador detectable. Los marcadores detectables útiles en la presente invención incluyen biotina o estreptavidina, microesferas magnéticas, tintes fluorescentes (p. ej., isotiocianato de fluoresceína, rojo de Texas, rodamina, proteína verde fluorescente, y similares), radiomarcadores (p. ej., ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , ^{32}P , ^{111}In , ^{97}Ru , ^{67}Ga , ^{68}Ga , o ^{72}As), sustancias radiopacas, tales como metales para el diagnóstico por imágenes radiológicas, agentes paramagnéticos para el diagnóstico por imágenes de resonancia magnética, enzimas (p. ej., peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras empleadas habitualmente en un ELISA), y marcadores colorimétricos, tales como oro coloidal o microesferas de vidrio o plástico coloreadas (p. ej., poliestireno, polipropileno, látex, etc.). Los medios para detectar dichas etiquetas se conocen adecuadamente por los expertos en la materia. Por consiguiente, por ejemplo, los radiomarcadores pueden detectarse utilizando películas fotográficas o contadores de centelleo. Los marcadores fluorescentes pueden utilizarse igualmente y pueden detectarse al emplear un fotodetector para detectar la iluminación emitida. Los marcadores enzimáticos se detectan en general disponiendo la enzima con un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima en el sustrato, y los marcadores colorimétricos se detectan simplemente visualizando el marcador coloreado.

La presente invención también abarca moléculas de ácido nucleico que codifican AMs completamente humanos específicos para IL-1 α humana como se define en las reivindicaciones. Aunque la misma molécula de ácido nucleico puede codificar tanto las cadenas pesadas como las ligeras de un AcM específico para IL-1 α humana, podrían utilizarse también dos moléculas de ácido nucleico diferentes, una codificante de la cadena pesada y la otra codificante de la cadena ligera. Las secuencias de aminoácidos de tres AMs IgG1específicos para IL-1 α humana se exponen en el presente documento. Véanse las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 y 11. Las moléculas de ácido nucleico a modo de ejemplo codificantes de estas secuencias de aminoácidos también se describen en el presente documento. Véanse las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, y 12. Puede utilizarse cualquier otro ácido nucleico adecuado que codifica las secuencias de aminoácidos de los dos AMs IgG1 descritos u otros AMs de la invención.

Para la producción de AMs, las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden incorporarse en un vector de expresión con una orientación en la que dichas moléculas de ácido nucleico se unen operativamente a secuencias de control de la expresión, tales como secuencias de control de transcripción y traducción. Ejemplos de vectores de expresión incluyen vectores obtenidos a partir de plásmidos y vectores obtenidos a partir de virus, tales como adenovirus, virus adeno-asociados, y retrovirus. Las moléculas de ácido nucleico codificantes de una cadena ligera y una cadena pesada podrían incorporarse en un único vector o vectores diferentes. Los vectores de la invención también pueden incluir secuencias reguladoras, tales como promotores y/o potenciadores (véanse, patente de Estados Unidos n.º 5.168.062, patente de Estados Unidos n.º 4.510.245 y patente de Estados Unidos n.º 4.968.615), marcadores seleccionables, o secuencias codificantes de las etiquetas de afinidad (para facilitar la purificación) o un marcador detectable.

Para la producción de AMs, los vectores de la invención pueden introducirse en una célula hospedadora adecuada, p. ej., una célula procariota, tal como una bacteria o, preferentemente, una célula eucariota, tal como una célula hospedadora de mamífero, vegetal, o de levadura. Ejemplos de métodos para introducir polinucleótidos heterólogos en células hospedadoras incluyen el uso de vectores virales, electroporación, encapsulación del(los) polinucleótido(s) en liposomas, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación biolística y microinyección directa del ADN en los núcleos. Se prefieren actualmente líneas celulares de mamífero para la expresión de AMs a partir de vectores. Ejemplos de células hospedadoras de mamífero incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) (p. ej., la línea celular CHO DG44), células HeLa, células hepáticas de cría de hámster (BHK), células hepáticas de mono verde africano (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p. ej., Hep G2), células NS0, células SP2, células HEK-293T, células Freestyle 293, y células NIH-3T3. Los AMs de la invención también pueden expresarse en animales transgénicos o plantas. Véanse, p. ej., las patentes de Estados Unidos n.º 5.827.690; 5.756.687; 5.750.172; 5.741.957; 6.046.037; y 5.959.177.

La divulgación describe un método para detectar una célula que expresa IL-1 α humana en una muestra poniendo en contacto la célula con un AcM específico para IL-1 α humana y detectando el AcM unido a la célula. La invención proporciona además un método para destruir una célula que expresa IL-1 α humana poniendo en contacto la célula con un AcM específico para IL-1 α humana. Dicha destrucción puede lograrse por la destrucción mediada por el complemento, citotoxicidad mediada por células dependientes de Ac, o administración mediada por Ac de una citotoxina. Los Acs descritos en el presente documento han demostrado también resultar útiles en otros métodos. Por ejemplo, MABp1 se ha utilizado para reducir la expresión de ICAM1 y E-selectina inducida por IL-1 α en las células endoteliales. Se ha demostrado igualmente que MABp1 se utiliza en inmunoensayos para detectar y cuantificar IL-1 α en una muestra biológica.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Clonación de IgG1 anti-hIL-1 α y cadenas Kappa

Las secuencias de la región variable de la cadena pesada (RV-CP) y la región variable de la cadena ligera (RV-CL) se sintetizaron génicamente empleando información de la secuencia de aminoácidos proporcionada en la patente de Estados Unidos n.º 5.959.085. RV-CP se amplificó por PCR introduciendo sitios HindIII/ClaI corriente arriba del codón de inicio ATG y un sitio NheI en el extremo 3'. La región constante IgG1 de la línea germinal humana (incluyendo intrones y exones) se amplificó por PCR modificando los dos tripletes 5' codificantes de los dos primeros aminoácidos Ala-Ser a un sitio NheI, e introduciendo un sitio BamHI en el extremo 3'. La secuencia de aminoácidos de la región constante IgG1 de la línea germinal humana correspondió a la entrada Swiss-Prot P01857, a excepción de un intercambio K171Q y V261L. La RV-CP y la secuencia de la constante IgG1-CP se ligaron empleando el sitio NheI y se clonaron en pcDNA3 utilizando los sitios HindIII y BamHI.

>hIL-1a-IgG1-CP

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSMFG
 VHWVRQAPGKGLEWVA AVSYDGSNKYYAESVKGRFTISRDN SKNILFLQMD
 —SLRLEDTAVYYCARGRPKVVIPAPLAHWGQGT LVTFSASTKGPSVFPLAPSS
 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAQTK
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIALEWESNGQPENNYKTP
 PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO:1)

5 >hIL-1a-IgG1-CP

atggagttcgggctgagttgggtgttctggtggctctgctgcggggcgtgcagtgccaggtgcagctggtggagagtgg
 ggggtggcgtggtgcagcctggccggtctctgcgcctgcttgcactgcctccggtttacctttctatgtttggtgtgcactgg
 gtgcgccaggctcccggcaagggactggaatgggtggccgccgtgagttacgacgggtccaacaaatattacgtgaga
 gctgtaaaggcagattcaccatcagcagagataattccaagaatattctgttctgcagatggacagctctgagactggagg
 aactgtgtgtactactgcgtcgtggacgccctaagggtgtcatccccgccccctggcacattggggccagggaactc
 tggtagacatttttagcgtagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcacccctcctccaagagcacctctgggggca
 cagcgccctgggtgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtagcgtgtcgtggaactcaggcgccctgaccag
 cggcgtccacaccttcccgggtgtcctacagtcctcaggactctactcctcagcagcgtagtaccgtgcctccagcag
 cttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttagcccaaa
 tctttagacaaaactcacatgcccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagttcttcttcccccaa
 aaccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtgggtggacgtgagccacgaagaccctga

 ggtaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccagacaaagccgaggaggagcagtagacaacag
 cacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactgggtgaatggcaaggagtacaagtgaagggtctcca
 aaaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacacc
 tggcccatcccgggatgagctgaccaagaaccagggtcagcctgacctgcctgggtcaaggcttctatcccagcgacatc
 gccctggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctcc
 ttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaactcttctcatgctccgtgatgcatgag
 gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccttaagtcgggaaaataa (SEQ ID NO:2)

10 La RV-CL se amplificó por PCR introduciendo los sitios HindIII/Clal corriente arriba del codón de inicio ATG y un sitio BsiWI en el extremo 3'. La secuencia de Kappa-CL constante humana se amplificó por PCR introduciendo un sitio BsiWI en el extremo 5' codificante de un Arg adicional, los primeros aminoácidos Thr, y un sitio BamHI en el extremo 3'. La secuencia de aminoácidos Kappa-CL constante humana correspondió a la entrada Swiss Prot P01834. Las secuencias RV-CP y Kappa-CL constante se ligaron utilizando el sitio BsiWI y se clonaron en pcDNA3 utilizando los sitios HindIII y BamHI.

15

>hIL-1a-K-CL

MDMRVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVTTICRASQGISS
WLAWYQQKPGKAPKLLIYEASNLETGVPSRFSGSGSGSDFTLTISLQPEDFA
TYYCQQTSSFLLSFGGGTKVEHRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO:3]

>hIL-1a-K-CL

5

atggacatgcgcgtgccgcccagctgctgggctgctgctgctggttcctggatctaggtgcgacattcagatgacc
cagtccccagctcagtgtagcctccgtggcgacagagtacaatcacctgccgcctctcaggaatcttagttgg
ctggcctggtaccagcagaagcctgaaaggccccaagctgctgatctatgaagcctccaacctggagaccggcgtgc
cctctcgctcagcggctcaggctcaggcagtgatttactctgaccatcagctccctgcagccagaggatttcgctacttact
actgccagcagacctctctctctgctgctcctcgggggaggcacaaaggaggagcaccgtacgggtggctgcaccatctg
tcttcattctcccgccatctgatgagcagtgaaatctggaactgcctctgtgtgctgctgaataacttctatcccagaga
ggccaaagtacagtggaagggtgataaacgccctccaatcgggtaactccaggagagtgacacagagcaggacagcaa
ggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcga
agtcacccatcaggcctgagttcaccgggtgacaaagagcttcaacaggggagagtgtag[SEQ ID NO:4]

Ejemplo 2 - Generación de NATHMAB-hIL-1a IgG1y cadena Kappa

- 10 La secuencia completa codificante de NATHMAB-hIL-1a/cadena pesada de IgG1 se sintetizó génicamente. La secuencia RV-CP correspondía a la secuencia de aminoácidos descrita en la patente de Estados Unidos 5.959.085. La secuencia de IgG1-CP constante humana correspondía a la entrada Swiss-Prot P01857. La secuencia de nucleótidos era un codón optimizado para la expresión en células CHO. Se añadió una secuencia de Kozac (gccacc) corriente arriba del inicio ATG.

15

>NATHMAB-hIL-1A-IGG1-CP

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSMFG
VHWVRQAPGKGLEWVAASVSYDGSNKYYAESVKGRETI SRDNSKNILFLQMD
SLRLED TAVYYCARGRPKVVIPAPLAHWGQGT LVTFSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGPP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
[SEQ ID NO:5]

>NATHMAB-hIL-1A-IGG1`CP

gccacatggagtttggtctgtcctgggtgttcttggtggctctgctgaggggggtgcagtgccagggtccagctggaggagt
ctgggtgggggagtggtgcagcctgggagatctctgcggctgtcttgactgcctctggttcactttctctatgttggtgtgca
ttgggtcaggcaagcaccaggcaaaaggactcagtggtgctgcagctgtgagctatgacgggttaacaaatattacgctg
agtctgtcaagggtaggtttaccatcagccgggataattccaaaaatctctgttctgcaaatggactctctgaggctggaa
gatactgcagctactattgtgcaagggggaggccaaagggtgatccccgtcccctcgtcactggggacagggaac
cctggtgactttcagctctgtagcacaagggccctagcgtgttccattggctccttctccaaatctacttctggaggcac
cgccgccctgggatgtctgtgaaagatttttctgagcccgtcaccgtgagctggaacagcggcgccctgactagcgg
cgtgcacacctttccgcagtgctgcaatctagcgggctgtactccctgagctctgtctgaccgtgccctccagcagcctc
ggaactcagacctacatctgcaatgtcaatcataaacctctaatacaaagtcgataagaagggtgaacctaaatcttgca
taaaaccatacctgcccccttggccagcaccgaactgctgggcgtccctctgtgttctgttccccccaaaccctaaa
gataccctgatgatctctaggacccccgaggtcactgtgtctggtggatgtgtccacgaagatccagaagtcaaattca

actggtatgtggacgggggtcgaagtgcacaacgcaaagaccaagcctaggagggaacagtataatgacatatagggt
ggctcagctcctgaccgtctgcatcaggactggctgaatggcaagaatataagtgtaaagtgtccaacaaggccctgcc
agccccaatcgaaaagacaatctctaaagccaaggggcaaccccggaacctcaggtctatactgccaccctctcgg
gatgaactgaccaagaatcaggtgagcctgacatgtctgtgaagggttttatccctccgacattgccgtggagtgggaga
gcaatggacaaccagaaaataactacaaaaccacacccctgtgctggactccgatggttcttcttctctactctaagctg
acagtgataagtctaggtggcagcaggggaatgtgttctctgctctgtgatgcacgaggcactgcacaatcattatacac
aaaagtctctgtctctgtctccaggaaagtaa [SEQ ID NO:6]

- 5 La secuencia completa codificante de NATHMAB-hIL-1a/cadena ligera Kappa se sintetizó génicamente. La secuencia RV-CL correspondía a la secuencia de aminoácidos descrita en la patente de Estados Unidos 5.959.085. La secuencia de Kappa-CL constante humana correspondía a la entrada Swiss-Prot P01834. La secuencia de nucleótidos era un codón optimizado para la expresión en células CHO. Se añadió una secuencia de Kozac (gccacc) corriente arriba del ATG.

10

>NATHMAB-hIL-1A-K-CL

MDMRVPAQLLGLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISS
WLAWYQQKPGKAPKLLIYEASNLETGVPSRFSGSGSGSDFTLTISLQPEDFA
TYYCQQTSSFLLSFGGGTKVEHTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO:7]

15

NATHMAB-hIL-1A-K-CL

gccaccatggacatgcgcgttcctgccagctcctcggactgctgctgtttggtcccaggctcccgggtgatattcag
 atgacacagtctccctcctccgtatctgcatccgtggcgacagggtcacaatcacttgtagggccagccaggggatctc
 tagttggctcgcattggtaccaaaaaagccaggtaaggctccgaaactgctcatttacgaagctagtaacctcgaacag
 gcgtgccaagccgggttagcggctccgggttcctgacttcaccctcactatttcctccctgcaacctgaggattttgcc
 acatattactgtcagcaaaactctctttctgctctcctttggtgggggaactaagggtggagcacacagtggccgccccca
 gcgtctttatcttcccccaagcgatgaacagctgaagtcagggaccgccagcgtgggtctgcctgctcaataattttaccc
 tcgcgaggctaaggccaatggaaagtggataacgccctccagagcggtaactctcaggagtctgtcacagagcaaga
 cagcaaggatagcacctattccctctccagcaccctgacactgtctaaggccgactacgagaaacacaaagtgtacgctt
 gtgaggtgactcaccagggtgagtagccctgtgacaaaatcttcaataggggagaatgctga [SEQ ID
 NO:8]

Ejemplo 3 - Expresión de NATHMAB-IL1-a (IgG1/subtipo k)

NATHMAB-IL-1 α se expresó y se purificó utilizando un método de transfección transitoria. El sobrenadante del cultivo celular o Ac purificado por afinidad a la proteína G se sometió a análisis adicional como se describe a continuación. Las células 293T hepáticas embrionarias humanas (HEK) se cultivaron en DMEM que contenía STF al 10 %, y se transfectaron transitoriamente utilizando el reactivo jetPEI (Polyplus) según el protocolo del fabricante. Las células se sembraron en placas de 10 cm (3x10⁶ células por placa de 10 cm) 24 horas antes de la transfección para alcanzar una densidad de aproximadamente 50 % en el momento de la transfección. Se utilizaron para la transfección 5 μ g por placa de pcDNA3-anti-hIL-1 α -IgG1-CP y un exceso molar de 2 veces de pcDNA3-anti-hIL-1 α -Kappa. Tras la recuperación, el medio se cambió a DMEM que contenía STF al 2 % (10 ml por placa) y se recogió AD durante 5 a 6 días. El sobrenadante se recogió, se filtró, se ajustó el pH a 7,5-8, y se almacenó a 4 °C hasta su posterior uso.

Parte del sobrenadante (250 ml) se incubó con proteína G sefarosa (GE Healthcare) durante 3 h a 4 °C en un agitador rotativo. A continuación, la proteína G sefarosa se cargó en una columna mediante flujo por gravedad y se lavó con TFS. Ac se eluyó en fracciones de 1 ml utilizando 100 mM de glicina/150 mM de NaCl en 100 μ l de Tris (pH 8), seguido de diálisis con TFS que contenía glicerol al 10 %. La concentración total de proteínas de cada fracción se midió empleando el kit de detección de proteínas BCA (Pierce). El tamaño correcto de las cadenas pesadas y ligeras, y del Ac nativo montado se confirmó por SDS-PAGE.

El sobrenadante que contiene Ac NATHMAB-hIL-1a purificado y lisados celulares de Triton X-100 de células 293T HEK productoras se ensayó para la unión de antígeno en un radioinmunoensayo (RAI) empleando ¹²⁵I-hIL-1 α . La unión se ensayó mediante la absorción a la proteína G. Todas las muestras se unieron a ¹²⁵I-hIL-1 α con mayor actividad en el eluato. La unión de NATHMAB-hIL-1 α purificado en una concentración de 0,012 % (actividad medio máximo en RAI) con respecto a ¹²⁵I-hIL-1 α se utilizó para medir el coeficiente de afinidad. La Ka de NATHMAB-hIL-1 α en estas condiciones era 3,03x10¹⁰ M⁻¹. El cálculo inducido reveló una concentración estimada de aproximadamente 30 μ g/ml de anti-hIL-1 α -IgG activa en el eluato purificado.

La actividad neutralizante de NATHMAB-hIL1 α se ensayó en un bioensayo utilizando la sublínea EL4-6.1 murina que produce altos niveles de IL-2 cuando se trata con IL-1 α murina o humana (Zubler *et al.*, *J. Immunol.* 134:3662-3668, 1985). Las concentraciones indicadas de NATHMAB-hIL-1 α (eluato) se incubaron durante 30 min a 37 °C con diferentes concentraciones de hIL-1 α recombinante (eBioscience) en un volumen final de 100 μ l/pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos (fondo plano). Cada punto se llevó a cabo por triplicado y en medio de cultivo (DMEM, STF al 5 %). A cada pocillo se añadieron 100 μ l de una suspensión de células ELA-6,1 (5x10⁵ células/ml) en medio de cultivo que contiene 0,2 μ g/ml de ionomicina. Tras la incubación durante 24 horas a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5 %, los sobrenadantes libres de células se recogieron y se analizaron para las concentraciones de IL-2 empleando ELISA disponible comercialmente (R&D Systems). Los resultados mostraron que NATHMAB-IL-1 α neutralizó eficazmente la secreción de IL-2- inducida por hIL-1 α por medio de las células EL-4.

Para ensayar la neutralización de hIL-1 α unida a la membrana, el mismo ensayo basado en células EL-4 como se ha descrito previamente se utilizó con las siguientes modificaciones. Diferentes concentraciones de NATHMAB-hIL-1 α (eluato) se incubaron con diversas cantidades de monocitos activados humanos. Para la preparación de los monocitos, se aislaron las CMSP a partir de la capa leucocitaria mediante centrifugación Ficoll-Paque. A los monocitos se les permitió la adhesión durante 1,5 h a 37 °C en RPMI en placas de plástico. Los linfocitos no adherentes se lavaron para producir un cultivo de monocitos casi puro. Los monocitos se cultivaron en RPMI que

contenía Gln, Pyr, y STF al 10 % durante 24 h con LPS (1µg/ml) a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5 %. Las células se separaron con TFS/2 mM de EDTA, se retiraron cuidadosamente de las placas, y se transfirieron a tubos Falcon. Las células se lavaron dos veces con TFS, se volvieron a suspender en TFS/PFA al 1 % y se fijaron durante 10 minutos a 20 °C. Las células se lavaron con tampón glicina (150 mM de glicina, 75 mM de NaCl, pH 7,4), luego con medio de cultivo y se contaron. Los resultados mostraron que NATHMAB-hIL-1α neutralizó eficazmente la secreción de IL-2 por las células EL-4 inducidas por hIL-1α unida a la membrana. En un experimento similar al descrito previamente, NATHMAB-hIL-1α se ensayó para la neutralización de IL-1α murina. Se incubaron cantidades indicadas de sobrenadante de NATHMAB-hIL-1α con IL-1α recombinante humana (h) o murina (m) (eBioscience). El sobrenadante que contiene el Ac neutralizó IL-1α humana pero no murina.

Ejemplo 4- Destrucción mediada por Ac de las células cancerosas

Las células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP) aisladas de la capa leucocitaria por preparación convencional de Ficoll Paque se incubaron en cualquier RPMI-1640 CM o RPMI-1640-CM que contiene rhIL-2 (30 ng/ml, eBioscience) a 37 °C y CO₂ al 5 % durante la noche y se utilizaron como células efectoras (E). Se utilizaron células THP1 como las dianas (D). El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos con cada punto por triplicado. Tras 1x10⁴ dianas que se incubaron con diferentes concentraciones de MABp1 durante 15 minutos, se añadieron las células efectoras en una relación ED de 25:1 y 50:1 con respecto a 1x10⁴ dianas y se incubaron durante otras 4 horas. 75 µl de volumen de ensayo se transfirieron a una nueva placa de 96 pocillos y la citotoxicidad se analizó utilizando el kit de detección de citotoxicidad LDH (Roche) según el protocolo del fabricante. % de lisis específica = (liberación experimental media/liberación espontánea media sin anticuerpo) x 100/(liberación máxima media de las dianas-liberación espontánea media de las dianas) A. CMSP sin tratar se utilizaron como células efectoras. B. CMSP tratadas con rhIL-2 se utilizaron como células efectoras. En ambos casos, el aumento de las concentraciones (1,25 a 20 µg/ml) de MABp1 produjo un aumento de la destrucción de células diana (hasta aproximadamente 90 %) en ambas relaciones ED.

Ejemplo 5- Secuencias AcM específicas para anti-IL1α humana

La secuencia completa codificante para otra anti-hIL-1αIgG₁ humana/cadena ligera Kappa específica para IL1α humana (MABp1) se sintetizó y se expresó como se ha descrito previamente. En los ácidos nucleicos codificantes de las cadenas pesadas y ligeras, se añadió una secuencia de Kozac (gccacc) corriente arriba del inicio ATG.

Cadena pesada

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSMFG
VHWVRQAPGKGLEWVA AVSYDGSNKYYAESVKGRFTISRDN SKNIFLQMD
SLRLED TAVYYCARGRPKVVIPAPLAHWGQGLVTFSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
[SEQ ID NO:9]

gccaccatggagtttggtctgtcctgggtgttcttggtggctctgctgaggggggtgcagtgccaggtccagctggtggagt
ctggtgggggagtggtgcagcctgggagatctctcggtctgtctgactgcctctggttctactttctatgtttggtgtgca
ttgggtcaggcaagcaccaggcaaggactcgagtggtgcagctgtgagctatgacgggtctaacaaatattacgctg
agtctgtcaagggtaggtttaccatcagccgggataattccaaaatatcctgttctgcaaatggactctctgaggctggaa
gatactgcagcttactattgtgcaagggggaggccaaaggtggtgatccccgctcccctgctcactggggacaggggaac
cctggtgactttcagctctgtagaccaaggccctagcgtgttccattggctccttctccaaatctacttctgaggcac
cgccgcctgggatgtctctgtgaaagatttttctgagcccgctaccgtgagctggaacagcggcgcctgactagcgg

cgtgcacacctttcccgcagtgtgcaatctagcgggctgtactccctgagctctgtcgtgaccgtgccctccagcagcctc
 ggaactcagacctatctgcaatgtcaatcataaacctctaataccaaagtcgataagagggtcgaacctaatttgcg
 ataaaaccatactgcccccttgcagcagcagcgaactgtggcggtccctctgtgtttctgttccccccaaacccaa
 agataccctgatgatctctaggacccccgaggtcacttgtgtcgtggtggatgtgtccacgaagatccagaagtcaaattc
 aactggtatgtggacggggtcgaagtgcacaacgaaagaccaagcctaggagggaacagtataatgacacatataggg
 tggtcagcgtctgaccgtctgcatcaggactggctgaatggcaagaatataagtgtaaagtgtccaacaaggccctgc
 cagccccaatgaaaaagacaatctctaaagccaaggggcaacccgggaacctcaggtctatactgccaccctctcgg
 gaggaatgaccaagaatcaggtgagcctgacatgtctgtgaagggttttatccctccgacattgccgtggagtgggaga
 gcaatggacaaccagaaaataactacaaaaccacacccctgtgctggactccgatggttccttctctactctaaagctg
 acagtggataagctaggtggcagcaggggaatgtgttctctgtctgtgatgcacgaggcactgcacaatcattatacac
 aaaagtctctgtctgtctccaggaaagtaa [SEQ ID NO:10]

Cadena ligera

MDMRVPAQLLGLLLWFPGSRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVTTITCRASQGISS
 WLAWYQQKPKGKAPKLLIYEASNLETGVPSRFSGSGSGSDFTLTISLQPEDFA
 TYYCQQTSSFLLSFGGGTKVEHKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKH
 KVVACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC [SEQ ID NO:11]

gccaccatggacatgcgcgttctgcccagctcctcggactgctgctgttgggtcccagggtcccgggtgatattcagat
 gacacagtctccctcctcgtatctgcatccgtggcgacagggtcacaatcactgtagggccagccaggggatctctag
 ttggctcgcattgacaaacaaaagccaggttaaggctccgaaactgctcattacgaagctagtaacctcgaacaggcgt
 gccaaagccggtttagcggctccgggttctgacttaccctcactatttctcctcgaacctgaggattttgccacatat
 tactgtcagcaaaccttcttcttctgtctcctttggtggaggaactaagggtggagcacaagcggacagtgtgtctcctagc
 gtctttatcttccctccaagcgtgaacagctgaagtcaggagccgccagcgtggtctgctgtcctaataattttaccctcgc
 gaggctaagggtccaatggaaagtgataacgccctccagagcggttaactctcaggagtctgtcacagagcaagacagca
 aggatagcacctattcctcctccagcacctgacactgtctaaggccgactacgagaacacaaagtgtacgttgtgaggt
 gactcaccaggagctagtagccctgtgacaaaatcttcaataggggagaatgctga [SEQ ID NO:12]

5 Ejemplo 6 - Afinidad de Unión a MABp1

La afinidad de unión de MABp1 purificado se determinó empleando resonancia superficial de plasmón (RSP) en un instrumento BIAcore 2000 (GE Health Sciences). Un Ac (Fc) IgG anti-humano monoclonal de ratón se inmovilizó covalentemente en las células de flujo de un chip sensor CM5 utilizando un kit de captura de Ac humano y un kit de acoplamiento de amina (GE Health Sciences). Se alcanzaron normalmente niveles de inmovilización de 8.000-14.000 RU. Tras la inmovilización del Ac (Fc) de captura IgG anti-humano de ratón, se ejecutaron tres ciclos iniciales con tampón de migración HBS-EP (GE Health Sciences) y dos ciclos iniciales con MABp1 para estabilizar la superficie CM5 y eliminar cualquier Ac no unido covalentemente. Para el análisis, Ac MABp1 se diluyó en tampón de migración HBS-EP a una concentración final de 1 µg/ml y se inmovilizó a 700 RU en una célula de flujo del chip sensor CM5. La citoquina IL-1A humana libre de transportador (eBioscience, n.º 34-8019) se diluyó en serie en tampón de migración HBS-EP en un intervalo de ensayo de 100 nM a 0,05 nM. El caudal era de 30 µl/min. Los datos de disociación para cada dilución de citoquinas se registraron durante 15 minutos. La superficie CM5 se regeneró después de cada ciclo empleando una inyección única de MgCl₂ 3 M durante 25 segundos a un caudal de 30 µl/min. El software BiaEvaluation y un modelo de unión de Langmuir se utilizaron para ajustar los datos. La K_D para MABp1 determinó ser inferior a 2,0 x 10⁻¹⁰ M.

Ejemplo 7 - MABp1 inhibe la invasión de células tumorales de una matriz de la membrana basal

Matrigel (BD), una matriz de la membrana basal, se descongeló a 4 °C durante la noche y el diluido (5 mg/ml a 1 mg/ml) en medio de cultivo celular frío libre de suero. 100 µl de matrigel diluido se colocaron en las cámaras superiores de un cultivo polarizado de 24 pocillos (Costar) y el cultivo polarizado se incubó a 37 °C durante al menos 4 a 5 h para gelificación. Las células tumorales (MDA-MB-231 y THP-1) se recogieron de los matraces de cultivo tisular con tripsina/EDTA, se lavaron con medios de cultivo, y se volvieron a suspender en un medio que contenía SFB al 1 % en una densidad de 1 X 10⁶ células/ml. El matrigel gelificado se lavó gradualmente con los medios de cultivo libres de suero calentado, y se añadieron 100 µl de la suspensión celular a cada pocillo. La cámara inferior del cultivo polarizado se llenó con 600 µl de medio de cultivo, y las placas se incubaron a 37 °C durante 12 a 24 h.

Las células que no invadieron el matrigel se retiraron gradualmente de la parte superior de cada cultivo polarizado con un hisopo de algodón. Los cultivos polarizados se eliminaron a continuación de las placas de 24 pocillos y se tiñeron con cristal violeta tras la fijación de las células invadidas con etanol o metanol al 70 %. Las células invadidas se contaron en un microscopio óptico. El porcentaje de células que invaden el matrigel se inhibió significativamente en presencia de MABp1.

Ejemplo 8 -MABp1 bloquea el aumento de la expresión de ICAM1 en las células endoteliales.

Las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) (BD Biosciences) se sembraron en placas de 24 pocillos a 5×10^5 por pocillo en 1 ml de medio M-200 suplementado con suplemento de crecimiento bajo en suero (Invitrogen). Las células se dejaron reposar durante 3-4 horas. Se aspiró el medio y se añadió 1 ml de M-200 reciente por pocillo. MABp1 se añadió directamente a las células con 4,26 µg/ml, se coincubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, y a continuación, se añadió IL-1α humana recombinante (rhIL1A, eBioscience) a una concentración final de 40 pg/ml. Los pocillos de control positivo recibieron la adición de solo IL-1α. Las células HUVEC en ausencia de IL-1α o ausencia de MABp1 sirvieron como controles negativos. Tras 17-20 horas de incubación a 37 °C, CO₂ al 5 %, las células se retiraron de las placas por un tratamiento no enzimático durante 20 minutos utilizando reactivo CellStripper (Cellgro Mediatech) y luego se analizaron inmediatamente para la expresión de CD54 (ICAM-1) utilizando protocolos convencionales de citometría de flujo. El tampón de tinción contenía TFS de Dulbecco suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 2 %. AcM (ICAM-1) CD54 anti-humano de ratón conjugado con PE (eBioscience, clon HA58) o un control de isotipo IgGk de ratón conjugado con PE (eBioscience, n.º 12-4714) se utilizó según las instrucciones del fabricante para teñir las células HUVEC en un volumen de tinción de 100 microlitros durante 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se llevaron a cabo dos lavados en tampón de tinción y luego las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences). Entre varios experimentos independientes (n=5) el aumento de las moléculas de adhesión de ICAM-1 inducida por rhIL1A en la superficie de células HUVEC se neutralizó mediante MABp1 a los niveles iniciales exhibidos por las células HUVEC no estimuladas.

Ejemplo 9 - MABp1 bloquea el aumento de la expresión de E-selectina en las células endoteliales.

De manera similar a sus efectos en la inducción de ICAM-1, se observó también la neutralización mediada por MABp1 de la inducción de CD62E (E-selectina) en células HUVEC. Este efecto era más pronunciado cuando las células HUVEC se estimularon no por rhIL-1a soluble sino por IL-1α membranosa anclada por glicosil-fosfatidilinositol a la superficie de células CHO DG44 (células GPI-IL1A). En este experimento, los cultivos confluentes de células HUVEC en placas de 6 pocillos se cocultivaron durante la noche con 5×10^6 células DG44 GPI-IL1A en medio M-200, solo, en presencia de 10 µg/ml de MABp1, o en presencia de 10 µg/ml de Ac de control del isotipo D5. Tras 17-20 horas, las monocapas HUVEC se lavaron extensamente con TFS de Dulbecco y se recogieron por el tratamiento no enzimático durante 20 minutos con el reactivo CellStripper (Cellgro Mediatech) y a continuación se analizaron inmediatamente para la expresión de CD62E (E-selectina) utilizando protocolos convencionales de citometría de flujo. El tampón de tinción contenía TFS de Dulbecco suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 2 %. AcM CD62E anti-humano de ratón conjugado con PE (eBioscience, clon P2H3) o un control de isotipo IgGk de ratón conjugado con PE (eBioscience, clon P3) se utilizó según las instrucciones del fabricante para teñir las células HUVEC en un volumen de tinción de 100 microlitros durante 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se llevaron a cabo dos lavados en tampón de tinción y luego las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences). La expresión de E-selectina aumentada en la superficie de las células HUVEC inducidas por GPI-IL-1a membranosa se neutralizó mediante MABp1 a los niveles iniciales exhibidos por las células HUVEC no estimuladas.

Ejemplo 10 - Bioensayo MRC-5 para la potencia de MABp1 (neutralización de rhIL1A)

La línea celular MRC-5, obtenida a partir de fibroblastos pulmonares humanos fetales, se obtuvo de la colección CACT (CCL-171). La potencia neutralizante de IL-1 de MABp1 se analizó midiendo la liberación inducida por IL-1A de IL-6 a partir de células MRC-5. Las células MRC-5 se sembraron a 5×10^3 por pocillo a una placa de 96 pocillos en 100 microlitros de medio DMEM completo. Las células se cultivaron durante la noche a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5 %humidificada. Las células confluentes MRC-5 se cultivaron posteriormente otras 24 horas con 20 pg/ml de IL-1A humana recombinante (rhIL1A, eBioscience) solo o en presencia de concentraciones crecientes de MABp1. Las células de control negativo no se estimularon con rhIL1A. Después de las 24 horas, se recogieron los sobrenadantes y se analizaron para la liberación de IL-6 utilizando el kit ELISA IL-6 de eBioscience. La CI₅₀, o la concentración de MABp1 requerida para inhibir el 50 % de la liberación máxima de IL-6, se encontraba en el intervalo de 0,001-0,01 µg/ml.

Ejemplo 11 - MABp1 identifica células IL-1a +.

Se alicuotaron cien microlitros de sangre entera anticoagulada de heparina sódica en tubos de poliestireno de CCAF. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos con 1 mg de IgG humana (proteína A purificada) más 2 ml de suero fetal bovino inactivado por calor para bloquear los receptores Fc. Los AcM primarios se añadieron a la muestra: 1 mg de MABp1 marcado con Alexa-488, 1 mg de Ac IL1A humana anti-membrana

monoclonal marcada con FITC (FAB200F, R&D Systems), o 1 mg de un control de isotipo murino (IC002F, R&D Systems). Los AMs primarios se incubaron con la muestra durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Los eritrocitos de la muestra se lisaron a continuación (solución BD Biosciences PharmLyse) a temperatura ambiente durante 15 minutos, se centrifugaron a 300 x g durante 5 minutos, y se aspiraron. Los gránulos de muestra se lavaron tres veces con un 1 ml de solución salina equilibrada de Hank (SSEH) que contenía suero fetal bovino inactivado por calor al 2 %. La muestra se volvió a suspender en 0,3 ml de SSEH + SFB al 2 %, los datos se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCalibur y se analizaron mediante el software CellQuest. El análisis por citometría de flujo de CMSP humanas utilizando MABp1 mostró que sólo el 0,2 % de CMSP eran positivas para IL-1 α .

Ejemplo 12 - MABp1 para detectar y seguir infecciones e inflamación

El análisis por citometría de flujo (como en el Ejemplo 11) de CMSP humanas utilizando MABp1 mostró un aumento de 3,6 veces en el porcentaje de CMSP positivas para IL-1 α en un sujeto con una infección subclínica en comparación con un control normal. Del mismo modo, en un sujeto con una muela del juicio inflamada, se produjo un aumento en el porcentaje de CMSP positivas para IL-1 α ⁺. Una disminución sustancial en el número de CMSP para IL-1 α ⁺ se observó a partir de 14 a 45 días después de la extracción de la muela del juicio.

Ejemplo 13 - Inmunoensayo para detectar y/o cuantificar IL-1 a

En general, los niveles muy bajos de IL- α están presentes en el plasma de sujetos humanos. Ya que estos niveles están más allá del umbral de detección de los inmunoensayos convencionales, se desarrolló un ELISA con una sensibilidad mejorada. En este ELISA, puede añadirse Ac anti-IL-1 α exógeno (p. ej., MABpl) a una muestra biológica que se está ensayando (p. ej., plasma humano) en condiciones que permiten que el Ac se una a IL-1 α en la muestra. Puesto que se observó que casi todas las IL-1 α en muestras de plasma humano ya estaban unidas a Ac anti-IL-1 α endógeno, esta última etapa puede omitirse a menudo. La muestra con complejos de IL-1 α -Ac se aplica entonces a un filtro (dispositivo de centrifugación Amicon) con un peso molecular de corte de aproximadamente 100 kDa para separar los complejos de IL-1 α -Ac a partir de moléculas en la muestra inferiores al peso molecular de corte. En un experimento, esto dio lugar a una concentración de 50 veces. Se añadió entonces la muestra procesada (y diluciones de las mismas) a los pocillos de una placa de microtitulación recubierta con un Ac de captura IgG anti-humana (2 ug/ml de IgG anti-humana de ratón, específica para Fc, Southern Biotech código del producto n.º 9042-01). Pasado un tiempo para unir los complejos IL-1 α -Ac de la muestra, los pocillos se lavaron para eliminar el material no vinculante. A continuación, se añadió Ac secundario IL-1 α anti-humano marcado a los pocillos (0,2 ug/ml de Ac IL-1A anti-humano monoclonal de ratón conjugado con biotina, clon CRM6, eBioscience catálogo n.º 13-7017). Después de permitir un tiempo para unir la IL-1 α en los pocillos, la placa se lavó y la cantidad de IL-1 α anti-humano marcado en cada pocillo se cuantificó como una indicación de la concentración de IL-1 α en la muestra que se está ensayando.

Otras realizaciones

Ha de entenderse que aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción previa tiene por objeto ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un AcM IgG1 humano purificado que se une específicamente a IL-1 α humana, el AcM que comprende una cadena pesada unida covalentemente a una cadena ligera, en el que la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.
2. Un conjunto de ácidos nucleicos aislados que comprende un primer ácido nucleico codificante de la cadena pesada de un AcM IgG1 humano que se une específicamente a IL-1 α , y un segundo ácido nucleico codificante de la cadena ligera del AcM IgG1 humano que se une específicamente a IL-1 α humana, en el que el primer ácido nucleico codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y el segundo ácido nucleico codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.
3. El conjunto de ácidos nucleicos aislados de la reivindicación 2, en el que el primer ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 10 y el segundo ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 12.
4. El conjunto de ácidos nucleicos aislados de la reivindicación 2, en el que el conjunto de ácidos nucleicos aislados se comprende en al menos un vector de expresión.
5. El conjunto de ácidos nucleicos aislados de la reivindicación 3, en el que el conjunto de ácidos nucleicos aislados se comprende en al menos un vector de expresión.
6. El conjunto de ácidos nucleicos aislados de la reivindicación 2, en el que el conjunto de ácidos nucleicos aislados se comprende en una célula hospedadora aislada.
7. El conjunto de ácidos nucleicos aislados de la reivindicación 6, en el que la célula hospedadora es una célula de mamífero.
8. Una célula hospedadora en la que se ha introducido ácidos nucleicos aislados que comprenden un primer ácido nucleico codificante de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y un segundo ácido nucleico codificante de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.
9. La célula hospedadora de la reivindicación 8, en la que el conjunto de ácidos nucleicos aislados se comprende en al menos un vector de expresión.
10. La célula hospedadora de la reivindicación 8, en la que la célula hospedadora es una célula de mamífero.
11. La célula hospedadora de la reivindicación 10, en la que la célula hospedadora es una célula de ovario de hámster chino.
12. Un anticuerpo monoclonal IgG1 humano que se une específicamente a IL-1 α , en el que el anticuerpo monoclonal comprende la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina producida expresando en una célula hospedadora de mamífero un primer ácido nucleico codificante de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y un segundo ácido nucleico codificante de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.
13. El anticuerpo monoclonal IgG1 humano de la reivindicación 12, en el que la célula hospedadora de mamífero es una célula de ovario de hámster chino.