

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 829**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2013 PCT/EP2013/073009**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14068132**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2013 E 13786473 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 2914287**

54 Título: **Miembros de unión a IL-1 beta**

30 Prioridad:

05.11.2012 EP 12007503
05.11.2012 US 201261722532 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.11.2020

73 Titular/es:

DELENEX THERAPEUTICS AG (100.0%)
Wagistrasse 27
8952 Schlieren, CH

72 Inventor/es:

GRABULOVSKI, STEFANIE;
KRETZSCHMAR, TITUS;
SCHMITT, SIMONE;
SHAMSHIEV, ABDIJAPAR y
SCHÄFER, THORSTEN ALEXANDER

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 795 829 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

Miembros de unión a IL-1 beta

La invención se refiere a anticuerpos anti-IL1 beta humanizados, en particular fragmentos de anticuerpos anti-IL-1 beta monovalentes, altamente potentes. La invención también se refiere a ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos, vectores, células hospedadoras que contienen dichas secuencias, composiciones farmacéuticas y de diagnóstico que comprenden los anticuerpos o ácidos nucleicos, y usos de los mismos.

Antecedentes de la invención

La interleucina-1 beta (IL-1 beta) es una citocina proinflamatoria que se produce como un precursor por macrófagos activados. Tras la escisión proteolítica, la transducción de señales se inicia uniendo la forma activa a tipo I de receptor de IL-1 (IL-1R1) que a su vez se asocia con la proteína accesoria de receptor IL-1 transmembranario (IL-1RAP). El complejo formado es competente en la transducción de señales. Siendo un mediador clave en la respuesta inflamatoria, la citocina afecta varias actividades celulares tales como proliferación, diferenciación y apoptosis celular. Por tanto, IL-1 beta se ha considerado una diana importante para una variedad de productos farmacéuticos.

El documento de patente WO 2009/149370 desvela composiciones y métodos para el tratamiento y/o la prevención de artritis reumatoide, que comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de anticuerpo anti-IL1 -beta o un fragmento del mismo.

El documento de patente WO 2007/002261 desvela un anticuerpo de unión a IL-1 beta o un fragmento de unión a IL-1beta del mismo para tratar o prevenir una enfermedad, tal como artritis reumatoide o enfermedad de Crohn.

El documento de patente WO 2004/067568 desvela anticuerpos aislados o porciones de unión al antígeno de los mismos que se unen específicamente a IL-1 beta humana madura que se puede usar para tratar diversas enfermedades tales como artritis reumatoide, osteoartritis o neuroinflamación.

Todavía existe una necesidad en la materia de anticuerpos con alto potencial terapéutico contra IL-1 beta humana. Para ser terapéuticamente satisfactorio, es importante que dicho anticuerpo muestre características biofísicas y bioquímicas deseables. Por ejemplo, puesto que la IL-1 beta diana es una interleucina altamente eficiente que es potente a concentraciones muy bajas y así necesita ser ampliamente bloqueada, dicho anticuerpo necesita ser altamente potente, así como altamente estable y soluble.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona un fragmento de anticuerpo monovalente dirigido contra IL-1 beta que tiene una potencia inferior a 50 picomolar (pM), como se ha determinado por la concentración inhibidora al 50 % CI_{50} con respecto a inhibir el efecto biológico de IL-1 beta humana.

Los fragmentos de anticuerpos monovalentes, tanto humanizados como no, que tienen valores de potencia en el intervalo pM son particulares y no se obtienen rutinariamente. Además, y normalmente, un anticuerpo pierde afinidad por su diana tras la humanización cuando se compara con el anticuerpo no humano parental. Es, por tanto, un reto humanizar un anticuerpo de forma que los parámetros de afinidad sean próximos o iguales al anticuerpo parental. Esto es particularmente cierto para fragmentos de anticuerpos monovalentes que comprenden solo una cadena ligera y pesada variable, y, por tanto, se unen a la diana menos fuertemente que los anticuerpos bivalentes que presentan dos cadenas ligeras y pesadas.

Además, cuando se convierte un anticuerpo de longitud completa en un fragmento más pequeño, su potencia normalmente llega a reducirse. Esto no solo es debido al cambio simultáneo de valencia (por ejemplo, el fragmento de anticuerpo solo podría ser monovalente, mientras que una inmunoglobulina de longitud completa es bi- o multivalente), sino que también se puede provocar por motivos estéricos.

Un potente anticuerpo es particularmente útil, puesto que permite administrar menores cantidades de fármaco al paciente, disminuyendo así los costes globales de tratamiento. Además, se vuelve factible una neutralización más completa de la diana molecular de la enfermedad.

Además, se pueden concebir diferentes vías de aplicación en modelos animales, así como en la terapia humana, cuando se aplican anticuerpos de potencia más alta. Por ejemplo, en cuanto a los fármacos tópicos, aunque la administración se puede limitar debido a la función barrera de la capa epitelial, la eficacia del tratamiento se restaura por la alta potencia de la cantidad limitada de moléculas de fármaco que atraviesa esta barrera fisiológica.

Frecuentemente, la alta cantidad de un fármaco menos potente, que se necesita administrar para lograr efectos farmacodinámicos similares, se traduce en volúmenes de administración intravenosa o subcutánea mucho más altos que con un fármaco más potente. Dichos volúmenes de administración más altos son una desventaja para su uso en los animales y seres humanos por dos motivos: en primer lugar, la impracticabilidad para tratar pacientes con un alto volumen de fármaco, y en segundo lugar, debido a que los anticuerpos son muy caros por unidad de masa.

Por tanto, menores cantidades de anticuerpo usados para el tratamiento se traducen en menores costes de producción del fármaco. En particular, los fragmentos de anticuerpos son adecuados para la producción usando, por ejemplo, sistemas de cultivo bacteriano o de levadura, que son de coste comparativamente más bajo que los sistemas de expresión en mamífero normalmente usados para la producción de inmunoglobulinas de longitud completa, tales como IgG. La combinación de cantidades más pequeñas de fármaco a administrar y procesos de fabricación más baratos abre la posibilidad de medicinas más rentables para el paciente. Así, se puede beneficiar un mayor número de pacientes de dicho fármaco.

Los parámetros de estabilidad y solubilidad son otros factores cruciales para proporcionar un medicamento viable. Cuanto más estable y soluble sea fármaco de anticuerpo, más pequeño es el volumen de administración y mayor es el tiempo de semivida en anaquel. Los anticuerpos proporcionados en el presente documento son altamente estables y solubles, es decir, siguen siendo monoméricos durante periodos de tiempo prolongados y también a altas concentraciones.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo, en particular el fragmento de anticuerpo monovalente anterior, que comprende

(a) las secuencias de la región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada variable (VH) CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 como se exponen en SEQ ID NOs: 1, 2 y 3; y

(b) las secuencias de la cadena ligera variable (VL) de CDR CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 como se exponen en SEQ ID NOs: 4, 5 y 6.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende

(a) una VH que tiene al menos 85 % de identidad con SEQ ID NO: 7 y/o

(b) una VL que tiene al menos 85 % de identidad con SEQ ID NO: 8.

El anticuerpo puede comprender una secuencia conectora, que es o deriva de SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que tiene al menos 85 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10.

En un aspecto, la invención proporciona una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica el anticuerpo o el miembro de unión como se define por las reivindicaciones.

En un aspecto, se proporciona un vector que comprende dicha secuencia de ácidos nucleicos.

En un aspecto, la invención proporciona una célula hospedadora que comprende la secuencia de ácidos nucleicos anterior o el vector anterior.

En un aspecto, una composición comprende el anticuerpo anterior, el miembro de unión anterior, la secuencia de ácidos nucleicos anterior, el vector anterior o la célula hospedadora anterior; y un vehículo, diluyente o excipiente adecuado adicional. La composición es preferentemente una composición farmacéutica, que comprende un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicha composición farmacéutica está preferentemente en una forma adecuada para administración tópica, intradérmica, transdérmica, intravenosa, subcutánea, intramuscular, parenteral, sublingual, bucal, oral, nasal, intranasal, rectal, local o ocular.

Se proporciona además un método de tratamiento de una enfermedad mediada por IL-1 beta que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo la composición farmacéutica anterior.

También se proporciona el anticuerpo anterior, el miembro de unión anterior, la secuencia de ácidos nucleicos anterior, el vector anterior o la célula hospedadora desvelada en el presente documento

(i) para su uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por IL-1 beta;

(ii) para su uso en diagnósticos;

(iii) para su uso en cosméticos; y/o

(iv) para fines de detección.

En aún otro aspecto, la invención proporciona un método de producción del anticuerpo o miembro de unión descrito en el presente documento, que o bien comprende (i) las etapas de cultivar la célula hospedadora anterior y recuperar y purificar el fragmento de anticuerpo o el miembro de unión, respectivamente; o (ii) el uso de un sistema sin células. Adicionalmente o alternativamente, el método puede comprender al menos una etapa de síntesis química de proteínas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los resultados de un ELISA para determinar la unión de DLX2323 a IL-1 beta recombinante humana (rh) a diversas concentraciones. Se representan las diferencias de absorbancia a una longitud de onda de 450 nm con respecto a la concentración de scFv dada en ng/mL. Cuadrados: DLX2323; círculos: control.

La Figura 2 es un gráfico que representa los resultados de la unión de DLX2323 a IL-1 beta humana natural en comparación con la unión a rhIL-1 beta. IL-1 beta humana natural derivó de sobrenadante de células THP-1 activadas. Se representan diferencias de absorbancia a una longitud de onda de 450 nm con respecto a la concentración de IL-1 beta dada en ng/mL. Cuadrados: rIL-1 beta; círculos: IL-1 beta natural.

La Figura 3 muestra comparaciones de DLX2323 con varios inhibidores de IL-1 beta comercialmente disponibles para la neutralización de rhIL-1 beta en un ensayo de fibroblastos humanos de dos experimentos independientes. La Figura 3A muestra los resultados para DLX2323 y MAB201. El eje y para indicar la liberación de IL-6 de fibroblastos humanos en pg/mL; el eje x para indicar la concentración de anticuerpo en pM. Cuadrados: DLX2323; círculos: MAB201 de control. La Figura 3B resume los datos para DLX2323, antagonista de receptor de rhIL-1 (ra) y canakinumab (Ilaris®), el eje y indica la liberación de IL-6 de fibroblastos humanos en pg/mL; el eje x indica la concentración de anticuerpos o rhIL-1ra en pM. Cuadrados: DLX2323; círculos: canakinumab; triángulos: rhIL-1ra.

La Figura 4 muestra la eficacia *in vivo* de DLX2323 en un modelo de inflamación de ratón inducido por IL-1 beta humana. Se cuantificó IL-6 (pg/mL) en suero después del tratamiento con IL-1 beta humana y o a) DLX2323 a 5 mg/mL; b) DLX2323 a 15 mg/mL; c) canakinumab; d) scFv de control; o d) PBS.

La Figura 5 ilustra la definición de CDR-H1 como se usa en el presente documento. Las flechas indican los restos de CDR-H1 según la definición Kabat (anterior) o como se usa en el presente documento (a continuación).

La Figura 6 ilustra los resultados de un ensayo de ELISA en donde lisados celulares depurados de variantes de DLX2323 expresadas en células de *E. coli* se unen a rhIL-1 beta recubierta. Se representan las diferencias de absorción a una longitud de onda de 450 nm como se observa para las muestras de proteína scFv indicadas. Se analizaron diluciones de muestra en un factor 1:2 (columnas grises) o 1:10 (columnas negras) en tampón de ensayo.

Descripción detallada

De manera que la invención pueda ser más fácilmente entendida, primero se definen ciertos términos. A menos que se defina de otro modo dentro de la memoria descriptiva, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen su significado reconocido en la técnica. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, se impondrá la presente memoria descriptiva, que incluye definiciones. Los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos solo y no pretender ser limitantes.

Dentro del alcance de la presente invención, el término "anticuerpo" se refiere a inmunoglobulinas de longitud completa, así como a fragmentos de las mismas. Dichas inmunoglobulinas de longitud completa pueden ser anticuerpos monoclonales, policlonales, quiméricos, humanizados, camuflados o humanos.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden porciones de una inmunoglobulina de longitud completa que retienen la especificidad de direccionamiento de dicha inmunoglobulina. Muchos, pero no todos, los fragmentos de anticuerpos carecen de al menos parcialmente la región constante (región Fc) de la inmunoglobulina de longitud completa. En algunas realizaciones, los fragmentos de anticuerpos se producen por digestión de la inmunoglobulina de longitud completa. Un fragmento de anticuerpo también puede ser una construcción sintética o recombinante que comprende partes de la inmunoglobulina o cadenas de inmunoglobulina (véase, por ejemplo, HOLLIGER, P. y Hudson, J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nature Biotechnology 2005, vol. 23, no. 9, p. 1126-1136). Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos, sin estar limitados a, incluyen fragmentos scFv, Fab, Fv, Fab', F(ab')₂.

"Fragmentos variables monocatenarios" o "anticuerpos monocatenarios" o "scFv" son un tipo de fragmentos de anticuerpos. Los scFv son proteínas de fusión que comprenden VH y VL de inmunoglobulinas conectadas por un conector. Así carecen de la región constante Fc presente en las inmunoglobulinas de longitud completa, pero retienen la especificidad de la inmunoglobulina original.

Un "miembro de unión" como se usa en el presente documento se refiere a inmunoglobulinas de longitud completa, fragmentos de anticuerpos, armazones no de anticuerpo, y/u otros compuestos de unión. Dicho miembro de unión puede ser monovalente o multivalente, es decir, tener uno o más sitios de unión al antígeno. Los ejemplos no limitantes de miembros de unión monovalentes incluyen scFv, fragmentos Fab, dAb, VHH, DARPin, afininas y

nanocuerpos. Un miembro de unión multivalente puede tener dos, tres, cuatro o más sitios de unión al antígeno por los que se pueden reconocer uno o más antígenos diferentes. Las inmunoglobulinas de longitud completa, fragmentos F(ab')₂, bis-scFv y diacuerpos son ejemplos no limitantes de miembros de unión multivalentes; en dichos miembros de unión multivalentes a modo de ejemplo, están presentes dos sitios de unión, es decir, el miembro de unión es bivalente.

En una realización, el miembro de unión multivalente es biespecífico, es decir, el miembro de unión se dirige contra dos dianas diferentes o dos sitios diana diferentes sobre una molécula diana. Los anticuerpos biespecíficos se revisan, por ejemplo, en MÜLLER, D. y Kontermann, R.E. Bispecific antibodies. Editado por DÜBEL, S. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. ISBN 3527314539. p. 345-378. En otra realización, el miembro de unión multivalente comprende más de dos, por ejemplo, tres o cuatro diferentes sitios de unión para tres o cuatro antígenos diferentes, respectivamente. Dicho miembro de unión es multivalente y multiespecífico, en particular tri- o tetra-específico, respectivamente.

"Armazones de no anticuerpo" son polipéptidos de unión al antígeno que se describen, por ejemplo, en FIELDER, M. y Skerra, A. Non-antibody scaffolds. Editado por DÜBEL, S. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. ISBN 3527314539. p. 467-500; o GILBRETH, R.N. y Koide, S. Structural insights for engineering binding proteins based on nonantibody scaffolds. Current Opinion in Structural Biology 2012, vol. 22, p. 413-420. Los ejemplos no limitantes incluyen afficuerpos, moléculas de afilina, adnectina, anticalina, DARPin, Knottin, dominio de tipo Kunitz, avímero, tetranectina y trans-cuerpo.

Los "compuestos de unión" son moléculas químicas o biológicas que se unen a una diana y que no pertenecen a la clase de inmunoglobulinas de longitud completa, fragmentos de anticuerpos y armazones de no anticuerpo como se ha definido anteriormente. Los ejemplos de compuestos de unión, sin estar limitados a, incluyen macrólidos (GUNDLURU, M. K. et al. Design, synthesis and initial biological evaluation of a novel pladienolide analog scaffold. MedChemComm. 2011, vol. 2, p. 904-908; PATERSON, I. et al. Total synthesis and biological evaluation of a series of macrocyclic hybrids and analogies of the antimetabolic natural products dictyostatin, discodermolide and taxol. Chem Asian J. 2011, vol. 6, p. 459-473; MORITA, H. et al. Synthesis of unnatural alkaloid scaffolds by exploiting plant polyketide synthase. PNAS 2011, vol. 108, p. 13504-13509), polímeros impresos moleculares (HOSHINO, Y. et al. Recognition, neutralization and clearance of target peptides in the blood stream of living mice by molecular imprinted polymer nanoparticles: a plastic antibody. Journal of the American Chemical Society, 2010, vol. 19, p. 664-6645), aptámeros (STREHLITZ, B., et al. Aptamers for pharmaceuticals and their application in environmental analytics. Bioanalytical reviews 2012, vol. 4, p. 1-30; YE, M. et al. Generating Aptamers by Cell-SELEX for Applications in Molecular Medicine. International Journal of Molecular Sciences 2012, vol. 13, p. 3341-3353), Spiegelmer (véase, por ejemplo, MAASCH, C. et al. Polyethylenimine-Polyplexes of Spiegelmer NOX-A50 directed against intracellular high mobility group protein A1 (HMGA1) reduce tumor growth in vivo. JBC 2010, vol. 285, p. 40012-40018), o péptidos (cíclicos o lineales, véase, por ejemplo, GOULD, A. et al. Cyclotides, a novel ultrastable polypeptide scaffold for drug discovery. Curr Pharm Des. 2011, vol. 17, p. 4294-4307).

La "CI₅₀" o "concentración inhibidora al 50 %" es una medida de la potencia de fármacos antagonistas y describe cuantitativamente la eficacia de un compuesto para inhibir una función biológica o bioquímica. Esta medida indica cuánto se necesita del compuesto para inhibir en 50 % un cierto proceso biológico o bioquímico. Aunque no es un indicador directo de afinidad, ambos valores se correlacionan y se pueden determinar por la ecuación de Cheng-Prusoff (CHENG Y. y Prusoff W.H. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. Biochemical Pharmacology 1973, vol. 22, p. 3099-3108; RAMMES, G., et al. Identification of a domain which affects kinetics and antagonistic potency of clozapine at 5-HT₃ receptors. PLOS one 2009, vol. 4, p. 1-14; ZHEN, J., et al. Concentration of receptor and ligand revisited in a modified receptor binding protocol for high-affinity radioligands: [3H] spiperone binding to D2 and D3 dopamine receptors. Journal of Neuroscience Methods 2010, vol. 188, p. 32-38).

El término "unión específica a IL-1 beta" como se usa en el presente documento describe que un miembro de unión se une a IL-1 beta con mayor afinidad que a un antígeno estructuralmente diferente que no comprende el epítipo de IL-1 beta al que se une el miembro de unión anti-IL-1 beta. La unión específica se refleja por una constante de equilibrio de disociación (K_D) inferior a 1 micromolar. Esta constante se puede determinar, por ejemplo, usando una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) en un instrumento Attana, o tecnología de resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un instrumento BIACORE.

Como se usa en el presente documento, "IL-1 beta" se refiere a la molécula como se describe en, por ejemplo, Dinarello C.A., Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. Nature reviews 2012, vol. 11, p. 633-652. "hIL-1 beta" como se usa en el presente documento se refiere a IL-1 beta humana. "rIL-1 beta" se refiere a IL-1 beta recombinante. IL-1 beta recombinante puede o puede no tener un resto de metionina en el extremo amino, que depende del método por el que se prepara. "rhIL-1" beta se refiere a IL-1 beta humana recombinante. rhIL-1 beta se puede obtener, por ejemplo, de Peprtech, EE. UU., Cat. N° 200-01B. IL-1 beta también se puede obtener por aislamiento de muestras biológicas de origen humano o no humano.

Anticuerpos "humanizados" se refieren a anticuerpos que comprenden una o más, normalmente las seis regiones CDR de un anticuerpo parental no humano o variantes del mismo, y cuya región estructural es, por ejemplo, (i) una

región estructural humana, que posiblemente comprende uno o más restos de la región estructural del anticuerpo parental no humano, o (ii) una región estructural de un anticuerpo no humano modificada para aumentar la similitud con regiones estructurales humanas naturalmente producidas. Se conocen en la técnica métodos de humanización de anticuerpos, véase, por ejemplo LEGER, O. y Saldanha, J. *Antibody Drug Discovery*. Editado por WOOD, C. London: Imperial College Press, 2011. ISBN 1848166281. p. 1-23.

"Región estructural" (FR) se refiere al armazón del dominio variable de inmunoglobulina, bien la cadena ligera variable (VL) o la cadena pesada variable (VH), incorporadas en las CDRs respectivas. Una región estructural VL y/o VH comprende normalmente cuatro secciones de región estructural, FR1, FR2, FR3 y FR4, que flanquean las regiones CDR. Así, como se conoce en la técnica, una VL tiene la estructura general: (FR-L1) - (CDR-L1) - (FR-L2) - (CDR-L2) - (FR-L3) - (CDR-L3) - (FR-L4), mientras que una VH tiene la estructura general: (FR-H1) - (CDR-H1) - (FR-H2) - (CDR-H2) - (FR-H3) - (CDR-H3) - (FR-H4).

"CDR" se refiere a las regiones hipervariables del anticuerpo que contribuyen principalmente a la unión al antígeno. Normalmente, un sitio de unión al antígeno comprende seis CDRs, incorporadas en un armazón de región estructural. En el presente documento, las CDRs del VL se denominan CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, mientras que las CDRs del VH se denominan CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3. Éstas se pueden identificar como se describe en KABAT, E.A., et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 5ª edición. Editado por U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Publicaciones de NIH, 1991. p. 91-3242. CDR-H1 como se usa en el presente documento, sin embargo, se diferencia de la definición de Kabat en que empieza con la posición 27 y termina antes de la posición 36 (véase la Figura 5 para ilustración).

Como se usa en el presente documento, el sistema de numeración para identificar posiciones de restos de aminoácidos en VH y VL del anticuerpo corresponde al sistema "Aho" descrito por HONEGGER, A. y Plückthun, A. *Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: An automatic modelling and analysis tool*. *Journal of Molecular Biology* 2001, vol. 309, p. 657-670. La publicación proporciona además tablas de conversión entre el sistema Aho y de Kabat (KABAT, E.A., et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 5ª edición. Editado por U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Publicaciones de NIH, 1991. p. 91-3242).

Un "anticuerpo aislado" o ácido nucleico es uno que se identifica y separa y/o recupera de al menos un componente de su entorno natural.

El término "identidad", como se usa en el presente documento, se refiere a la equivalencia de secuencias entre dos proteínas o ácidos nucleicos. Las secuencias de proteínas o de ácidos nucleicos a comparar se alinean dando identidad máxima, por ejemplo usando herramientas bioinformáticas tales como EMBOSS Needle (alineamiento por parejas; disponible en www.ebi.ac.uk). Cuando la misma posición en las secuencias a comparar está ocupada por la misma nucleobase o resto de aminoácido, entonces las moléculas respectivas son idénticas en esa posición precisa. Por consiguiente, el "porcentaje de identidad" es una función del número de posiciones equivalentes dividido entre el número de posiciones comparadas y multiplicado por 100 %. Por ejemplo, si 6 de las 10 posiciones de secuencia son idénticas, entonces la identidad es 60 %. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de proteínas se puede determinar, por ejemplo, usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (NEEDLEMAN, S.B. and Wunsch, C.D. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *Journal of Molecular Biology* 1970, vol. 48, p. 443-453) que se ha incorporado en EMBOSS Needle, usando una matriz BLOSUM62, una "penalización por apertura de hueco" de 10, una "penalización por extensión de hueco" de 0,5, una "penalización por hueco final" falsa, una "penalización por apertura de hueco final" de 10 y una "penalización por extensión de hueco final" de 0,5. Dos moléculas que tienen la misma secuencia primaria de aminoácidos o ácidos nucleicos son idénticas independientemente de cualquier modificación química y/o biológica. Por ejemplo, dos anticuerpos que tienen la misma secuencia primaria de aminoácidos, pero patrones de glucosilación diferentes, son idénticos por esta definición. En caso de ácidos nucleicos, por ejemplo, dos moléculas que tienen la misma secuencia pero diferentes componentes de enlace, tales como tiofosfato en lugar de fosfato, son idénticas por esta definición.

Secuencias "similares" de proteínas son aquellas que, cuando se alinean, comparten restos de aminoácidos similares y casi siempre, pero no obligatoriamente, restos de aminoácidos idénticos en las mismas posiciones de las secuencias a comparar. Los restos de aminoácidos similares se agrupan por características químicas de las cadenas laterales en familias. Dichas familias se describen a continuación para "sustituciones de aminoácidos conservativas". La "similitud en porcentaje" entre secuencias es el número de posiciones que contienen restos idénticos o similares en las mismas posiciones de secuencia de las secuencias a comparar dividido entre el número total de posiciones comparadas y multiplicado por 100 %. Por ejemplo, si 6 de las 10 posiciones de secuencia tienen restos de aminoácidos idénticos y 2 de las 10 posiciones contienen restos similares, entonces las secuencias tienen 80 % de similitud. La similitud entre dos secuencias se puede determinar, por ejemplo, usando EMBOSS Needle.

Una "variante" se refiere a una secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos que se diferencia de la secuencia parental en virtud de adición (incluyendo inserciones), delección y/o sustitución de uno o más restos de aminoácidos o nucleobases, mientras que retiene al menos una actividad deseada de la secuencia parental desvelada en el presente documento. En el caso de anticuerpos, dicha actividad deseada puede incluir unión al antígeno específico. Similarmente, se puede modificar una secuencia de ácidos nucleicos de variante cuando se compara con la

secuencia parental en virtud de adición, delección y/o sustitución de una o más nucleobases, pero el anticuerpo codificado retiene la actividad deseada como se ha descrito anteriormente. Las variantes pueden existir de forma natural, tales como variantes alélicas o de corte y empalme, o se pueden construir artificialmente.

Como se usa en el presente documento, el término "modificaciones conservativas" se refiere a modificaciones que son física, biológica, química o funcionalmente similares a la referencia correspondiente, por ejemplo, tiene un tamaño similar, forma, carga eléctrica, propiedades químicas, que incluyen la capacidad de formar enlaces covalentes o de hidrógeno, o similares. Dichas modificaciones conservativas incluyen, pero no se limitan a, una o más nucleobases y sustituciones, adiciones y delecciones de aminoácidos.

Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen aquellas en las que el resto de aminoácido se sustituye por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Por ejemplo, restos de aminoácidos que son no esenciales con respecto a la unión a un antígeno se pueden sustituir con otro resto de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales, por ejemplo se puede sustituir serina por treonina. Los restos de aminoácidos se dividen normalmente en familias basadas en propiedades comunes de cadenas laterales similares, tales como:

1. cadenas laterales no polares (por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina),
2. cadenas laterales polar sin carga (por ejemplo, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, prolina, cisteína, triptófano),
3. cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina, prolina),
4. cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico),
5. cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y
6. cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Una sustitución conservativa también puede implicar el uso de un aminoácido no natural.

Las sustituciones no conservativas, es decir, intercambiar miembros de una familia por miembros de otra familia, pueden conducir a cambios sustanciales, por ejemplo, con respecto a la carga, momento de dipolo, tamaño, hidrofilia, hidrofobia o conformación del miembro de unión, que puede conducir a una disminución significativa en la actividad de unión, en particular si están afectados aminoácidos que son esenciales para unirse a la molécula diana. Una sustitución no conservativa también puede implicar el uso de un aminoácido no natural.

Se pueden introducir modificaciones conservativas y no conservativas en miembros de unión parentales mediante una variedad de técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como química combinatoria, mutagénesis de ADN de sitio dirigido, mutagénesis mediada por PCR y/o de casete, síntesis química de péptidos/proteínas, reacción química que modifica específicamente grupos reactivos en el miembro de unión parental. Las variantes se pueden probar por métodos rutinarios para sus propiedades químicas, biológicas, biofísicas y/o bioquímicas.

Se pueden realizar reacciones de hibridación de ácidos nucleicos en condiciones de diferente rigurosidad. Las "condiciones rigurosas" son ampliamente conocidas y se publican en la técnica. Normalmente, durante la reacción de hibridación se puede usar un tampón basado en SSC en que SSC es NaCl 0,15 M y tampón citrato 15 mM que tiene un pH de 7,0. Aumentando las concentraciones de tampón y la presencia de un agente desnaturizante aumentan la rigurosidad de la etapa de hibridación. Por ejemplo, condiciones de hibridación de alta rigurosidad pueden implicar el uso de (i) 50 % (vol/vol) de formamida, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), 0,1 % de pirofosfato de sodio, 5 x disolución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/mL), 0,1 % de SDS y 10 % de sulfato de dextrano a 42 °C con lavados a 42 °C en 0,2 x SSC y 0,1 % de SDS; (ii) 50 % (vol/vol) de formamida con 0,1 % de albúmina de suero bovino/0,1 % de Ficoll/0,1 % de polivinilpirrolidona/tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42 °C, o (iii) 10 % de sulfato de dextrano, 2 x SSC, y 50 % de formamida a 55 °C, seguido por un lavado de alta rigurosidad que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55 °C. Adicionalmente o alternativamente, se pueden incluir una, dos o más etapas de lavado usando disoluciones de lavado de baja fuerza iónica y alta temperatura en el protocolo de hibridación usando, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M / citrato de sodio 0,0015 M / 0,1 % de dodecilsulfato de sodio a 50 °C.

Diversos aspectos de la invención se describen con más detalle en las siguientes subsecciones. Se entiende que las diversas realizaciones, preferencias e intervalos se pueden combinar a voluntad. Además, dependiendo de la realización específica, pueden no aplicar definiciones seleccionadas, realizaciones o intervalos.

En un primer aspecto, la invención proporciona un fragmento de anticuerpo monovalente que se une a IL-1 beta que inhibe el efecto biológico de IL-1 beta humana con una IC_{50} inferior a 50 pM. Dicha IC_{50} es preferentemente inferior a aproximadamente 40 pM, más preferentemente inferior a aproximadamente 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2 o 1 pM.

Preferentemente, dicho fragmento de anticuerpo monovalente tiene un peso molecular de aproximadamente 50 kDa o inferior, tal como aproximadamente 45 kDa, 40 kDa, 35 kDa o inferior, preferentemente aproximadamente 25 kDa, tal como 23, 24, 25, 26, o 27 kDa.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo, que comprende

- 5 (a) las secuencias de VH de CDR CDR-H1, CDR-H2 o CDR-H3 como se exponen en SEQ ID NOs: 1, 2 y 3, respectivamente; y
- (b) las secuencias de VL de CDR CDR-L1, CDR-L2 o CDR-L3 como se exponen en SEQ ID NOs: 4, 5, y 6, respectivamente.

10 Dicho anticuerpo tiene una potencia inhibidora muy alta contra IL-1 beta humana con una CI_{50} inferior a 50 pM, más preferentemente inferior a aproximadamente 40 pM, 30, 20, 10, e incluso más preferentemente inferior a 5 pM y lo más preferentemente aproximadamente 1 pM e inferior.

Preferentemente, el anticuerpo tiene una potencia inhibidora contra IL-1 beta humana con una CI_{50} de al menos 2 pM, más preferentemente de al menos 1 pM.

15 La CI_{50} se puede determinar, por ejemplo, usando un ensayo de potencia basado en células. En una realización, el valor de CI_{50} anterior se determina inhibiendo la liberación inducida por IL-1 beta de IL-6 de fibroblastos humanos. Dicho ensayo se basa en la observación de que los fibroblastos estimulados con IL-1 beta liberan IL-6. En presencia de anticuerpos que inhiben IL-1 beta, se reduce la concentración de IL-6 liberado. En una realización preferida, se usan células de fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF-Neo, por ejemplo, obtenibles de Lonza Walkersville USA, Cat. Nº CC-2509). Tras la incubación con una mezcla de hIL-1 beta y el anticuerpo de interés, se recogen sobrenadantes y se examinan por un ELISA de IL-6 tal como el kit de ELISA Human IL-6 DuoSet de R&D Systems (R&D Systems, Cat. Nº DY206). En una realización, el ensayo es el ensayo de neutralización de IL-1 beta como se describe en el Ejemplo 3. Preferentemente, el valor de CI_{50} es el valor medio obtenido de al menos tres repeticiones independientes de dicho ensayo.

25 El anticuerpo descrito en el presente documento puede ser una inmunoglobulina de longitud completa o un fragmento de anticuerpo, tal como a Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, fragmento Fv, nanocuerpo, VHH o unidad mínima de reconocimiento.

En una realización preferida, el anticuerpo y en particular el fragmento de anticuerpo monovalente anterior es un scFv. Los dominios VH y VL se pueden conectar en cualquier orientación, VL-conector-VH o VH-conector-VL, por un conector flexible. En una realización preferida, la orientación es VL-conector-VH, es decir, la región variable de la cadena ligera está en el extremo N y la región variable de la cadena pesada está en el extremo C del polipéptido.

30 El anticuerpo es preferentemente humanizado. Dicho anticuerpo humanizado puede comprender, por ejemplo, en la cadena ligera variable FR-L1 de SEQ ID NO: 18, FR-L2 de SEQ ID NO: 19, FR-L3 de SEQ ID NO: 20 y/o FR-L4 de SEQ ID NO: 21, o variantes de las mismas. Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo humanizado puede comprender la región estructural de la cadena pesada variable FR-H1 de SEQ ID NO: 22, 26 o 30; la región estructural de la cadena pesada variable FR-H2 de SEQ ID NO: 23, 27 o 31; la región estructural de la cadena pesada variable FR-H3 de SEQ ID NO: 24, 28 o 32; y/o la región estructural de la cadena pesada variable FR-H4 de SEQ ID NO: 25, 29 o 33.

35 Así, en una realización preferida, el anticuerpo comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 7 o una variante de la misma. Dicha variante tiene al menos 85 %, más preferentemente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % y lo más preferentemente 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 7.

Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo desvelado en el presente documento comprende la secuencia de VL de SEQ ID NO: 8 o una variante de la misma, respectivamente. Dicha variante tiene al menos 85 %, más preferentemente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % y lo más preferentemente 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 8.

45 En una realización mucho más preferida, el anticuerpo comprende VH como se expone en SEQ ID NO: 7 y VL como se expone en SEQ ID NO: 8. Las secuencias de la región estructural de tanto SEQ ID NO: 7 como SEQ ID NO: 8 derivan de una inmunoglobulina humana descrita en el documento de patente WO 03/097697 A (ESBATEch AG). Sus secuencias de VH y VL de la región estructural se han modificado por humanización y estabilización de anticuerpos de conejo, véase, por ejemplo, el documento de patente WO 2009/155726 A (ESBATEch, AN ALCON BIOMEDICAL RESEARCH UNIT LLC); BORRAS, L., et al. Generic approach for the generation of stable humanized single-chain Fv fragments from rabbit monoclonal antibodies. Journal of Biological Chemistry 2010, vol. 285, no. 12, p. 9054-9066. En una realización, la región estructural de VL del anticuerpo desvelado en el presente documento comprende SEQ ID NOs: 18-21 o variantes de la misma. Adicionalmente o alternativamente, la región estructural de VH del anticuerpo comprende SEQ ID NOs: 22-25, SEQ ID NOs: 26-29 o SEQ ID NOs: 30-33 o variantes de las mismas, respectivamente.

El anticuerpo, en particular en caso de un scFv, puede comprender una secuencia conectora. Dicha secuencia conectora tiene normalmente diez a aproximadamente 25 aminoácidos. Normalmente, dicho péptido conector es rico en glicinas, que confieren flexibilidad, así como serinas y/o treoninas para solubilidad mejorada. En una realización preferida, se usa un (conector GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 9) o una variante del mismo. También se pueden usar variaciones de dicho motivo que tienen tres a cinco repeticiones. Los conectores adecuados adicionales se describen, por ejemplo, en ALFTHAN, K. Properties of a single-chain antibody containing different linker peptides. Protein Engineering 1995, vol. 8, no. 7, p. 725-731.

En ciertas realizaciones, se contemplan variantes de los anticuerpos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, se puede desear mejorar la unión al antígeno, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), para aumentar la estabilidad o solubilidad, para reducir la inmunogenicidad y/o para alterar otras propiedades biológicas, bioquímicas o biofísicas del anticuerpo. En algunas realizaciones, la variante no muestra ninguna mejora con respecto al anticuerpo parental.

Se pueden preparar variantes de los anticuerpos proporcionados en el presente documento por manipulación de proteínas y/o química, introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el anticuerpo, o por síntesis de proteínas/péptidos. Se puede hacer cualquier combinación (combinaciones) de deleciones, sustituciones, adiciones e inserciones a la región estructural, a condición de que el anticuerpo generado posea las características deseadas para las que se pueda cribar usando métodos apropiados. Son de particular interés sustituciones, preferentemente sustituciones conservativas como se ha descrito anteriormente. Las sustituciones conservativas preferidas incluyen:

1. Sustituir alanina (A) por valina (V);
 2. Sustituir arginina (R) por lisina (K);
 3. Sustituir asparagina (N) por glutamina (Q);
 4. Sustituir ácido aspártico (D) por ácido glutámico (E);
 5. Sustituir cisteína (C) por serina (S);
 6. Sustituir ácido glutámico (E) por ácido aspártico (D);
 7. Sustituir glicina (G) por alanina (A);
 8. Sustituir histidina (H) por arginina (R) o lisina (K);
 9. Sustituir isoleucina (I) por leucina (L);
 10. Sustituir metionina (M) por leucina (L);
 11. Sustituir fenilalanina (F) por tirosina (Y);
 12. Sustituir prolina (P) por alanina (A);
 13. Sustituir serina (S) por treonina (T);
 14. Sustituir triptófano (W) por tirosina (Y);
 15. Sustituir fenilalanina (F) por triptófano (W);
 - y/o
 16. Sustituir valina (V) por leucina (L)
- y viceversa.

El anticuerpo descrito en el presente documento puede comprender uno o más, tales como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o más de dichas sustituciones conservativas.

Las sustituciones no conservativas pueden conducir a más cambios sustanciales, por ejemplo, con respecto a la carga, momento de dipolo, tamaño, hidrofilia, hidrofobia o conformación del polipéptido. En una realización, el anticuerpo comprende uno o más, tales como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o más de dichas sustituciones no conservativas.

Las modificaciones pueden estar presentes en las secuencias de la región estructural.

Adicionalmente o alternativamente, el VH del anticuerpo comprende mutaciones puntuales que mejoran la solubilidad. El documento de patente WO2009/155725 (ESBATEch, una empresa de Novartis) describe un motivo,

que ha demostrado que aumenta la solubilidad global del anticuerpo. Los restos se disponen en las posiciones localizadas en la interfase del dominio variable y el dominio constante de un anticuerpo y estabilizan fragmentos de anticuerpos, en particular scFv, que carece del dominio constante. En particular, están presentes uno, preferentemente los tres de los siguientes restos:

- 5 (i) serina (S) en la posición 12 de aminoácido de la cadena pesada (según la numeración de AHo);
- (ii) serina (S) o treonina (T) en la posición 103 de aminoácido de la cadena pesada (según la numeración de AHo); y/o
- (iii) serina (S) o treonina (T) en la posición 144 de aminoácido de la cadena pesada (según la numeración de AHo).

10 En una realización preferida, el anticuerpo tiene una serina en la posición 12 de VH; una serina en la posición 103 de VH; y una treonina en la posición 144 de VH (todos la numeración de AHo).

Así, en una realización, el anticuerpo desvelado en el presente documento comprende las secuencias de VH de la región estructural de SEQ ID NOs: 30-33 o variantes de las mismas.

Preferentemente, un anticuerpo de variante como se usa en el presente documento

- 15 (i) retiene unión específica a IL-1 beta, en particular a hIL-1 beta;
- (ii) tiene una potencia (CI₅₀) con respecto a inhibir el efecto biológico de IL-1 beta humana de menos de 500 pM, preferentemente menos de 400 pM, 300pM, 200 pM, 100 pM, 50 pM, más preferentemente de menos de 25 pM;
- (iii) reacciona de forma cruzada con IL-1 beta de cinomolgo, mono IL-1 beta de rhesus y/o IL-1 beta de rata;
- 20 (iv) compite con el anticuerpo desvelado en el presente documento para unirse a IL-1 beta, preferentemente IL-1 beta humana, IL-1 beta de cinomolgo, mono IL-1 beta de mono rhesus y/o IL-1 beta de rata, lo más preferentemente hIL-1 beta.

25 También se pueden preparar variantes por barajado de cadenas de cadenas ligeras y pesadas. Se puede combinar una cadena ligera sencilla con una biblioteca de cadenas pesadas para dar una biblioteca de variantes. En una realización, dicha cadena ligera sencilla se selecciona del grupo de secuencias de VL citadas anteriormente y/o dicha biblioteca de cadenas pesadas comprende una o más de las secuencias de VH citadas anteriormente. Asimismo, se puede combinar una cadena pesada sencilla con una biblioteca de cadenas ligeras. Preferentemente, dicha cadena pesada sencilla se selecciona del grupo de secuencias de VH citadas anteriormente y/o dicha biblioteca de cadenas ligeras comprende una o más de las secuencias de VL citadas anteriormente.

Un miembro de unión puede comprender cualquiera de las secuencias de VL y/o VH mencionadas anteriormente. Los miembros de unión que tienen un formato de dominio sencillo, tal como un nanocuerpo o un VHH, comprenden solo una de cualquiera de las secuencias de VL o VH mencionadas anteriormente, preferentemente la secuencia de VH. Miembros de unión multivalentes, en particular fragmentos F(ab')₂, bis-scFv o diacuerpos, preferentemente miembros de unión biespecíficos, pueden comprender una o más de las secuencias de VL mencionadas anteriormente y/o una o más de las secuencias de VH mencionadas anteriormente.

Los anticuerpos de la presente invención son particularmente estables. Como se usa en el presente documento, el término "estabilidad" se refiere a la propiedad biofísica del anticuerpo para seguir monomérico en disolución después de incubación prolongada y/o incubación a temperatura elevada. Los anticuerpos inestables tienden a dimerizar u oligomerizar e incluso precipitar, disminuyendo así la estabilidad en almacén y volviéndose menos adecuados para aplicaciones farmacéuticas.

Los anticuerpos proporcionados en el presente documento, y en particular el fragmento de anticuerpo monovalente anterior, siguen siendo monoméricos al menos hasta 75 %, preferentemente al menos hasta 80 %, 85 %, y lo más preferentemente hasta 93 % después de incubarse durante 1 mes a 37 °C a una concentración de 1 mg/mL en PBS a pH 7,2. Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo sigue siendo monomérico al menos hasta 90 %, preferentemente al menos hasta 92 %, 94 %, 96 %, 98 % más preferentemente hasta 100 % después de 1 mes a temperatura ambiente a una concentración de 1 mg/mL en PBS a pH 7,2.

El grado de monómeros se puede determinar, por ejemplo, por SEC-HPLC (cromatografía de exclusión por tamaño-cromatografía de líquidos de alto rendimiento). Una fase móvil adecuada para dicha prueba es, por ejemplo, PBS a pH 7,2. El contenido de monómero se puede cuantificar por integración de picos de la señal de UV280 medida durante la cromatografía de proteína. Un sistema adecuado es, por ejemplo, una HPLC Dionex Summit controlada por el software Chromeleon® 6.5 que también permite el posterior análisis de cromatogramas y la cuantificación de picos.

Los anticuerpos desvelados en el presente documento y en particular el fragmento de anticuerpo monovalente anterior también son estables a mayores concentraciones, por ejemplo, siguen siendo monoméricos al menos hasta 50 %, preferentemente al menos hasta 55 %, 60 %, 65 %, 70 % y lo más preferentemente hasta 75 % después de ser incubados durante 2 semanas a temperatura ambiente y/o 4 °C a una concentración de aproximadamente 50 mg/mL en PBS a pH 7,2.

Además, los anticuerpos proporcionados en el presente documento y en particular el fragmento de anticuerpo monovalente anterior son particularmente solubles y, por tanto, se pueden concentrar altamente sin precipitación debido a la formación de agregados. Preferentemente, los anticuerpos se pueden concentrar en PBS a pH 7,2 hasta una concentración superior a 20 mg/mL sin precipitación, más preferentemente hasta una concentración de 30 mg/mL, 40 mg/mL, 50 mg/mL, 60 mg/mL y lo más preferentemente hasta 70 mg/mL en PBS a pH 7,2.

En una realización mucho más preferida, el anticuerpo tiene una temperatura de fusión de aproximadamente 60 °C como se ha determinado por fluorimetría diferencial de barrido (DSF), preferentemente 65 °C, 70 °C, 71 °C, 72 °C, 73 °C y lo más preferentemente 74 °C. Este método se basa en las propiedades de ciertos colorantes de ser fluorescentes solo en un entorno hidrófobo. Por ejemplo, se puede detectar el desplegamiento de proteínas como un aumento en la fluorescencia tras la unión del colorante SYPRO® Orange a una proteína desnaturalizada por calor (NIESEN F.H. et al. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. Nature Protocols 2007, vol. 2, p. 2212-2221). La estabilidad de una proteína se puede así analizar por desnaturalización térmica.

El anticuerpo tiene preferentemente un punto isoeléctrico (pI) teórico en el intervalo de 5 a 10, preferentemente 7 a 9, lo más preferentemente aproximadamente 8,3. El pI teórico se puede calcular, por ejemplo, usando la herramienta ProtParam en el servidor ExPASy (disponible en <http://web.expasy.org/protparam/>; véase también GASTEIGER E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. (En) The Proteomics Protocols Handbook. Editado por WALKER J.M. Totowa: Humana Press Inc., 2005. ISBN 9781588295934. p. 571-607).

El anticuerpo puede reaccionar de forma cruzada con IL-1 beta de especie no humana, tal como, sin estar limitado a, IL-1 beta de cinomolgo, IL-1 beta de mono rhesus, IL-1 beta de rata, IL-1 beta murina, IL-1 beta canina, IL-1 beta felina, IL-1 beta de tití, IL-1 beta de cerdo y/o IL-1 beta de cobaya. Preferentemente, el anticuerpo reacciona de forma cruzada con IL-1 beta de cinomolgo (por ejemplo, se produce recombinantemente y está disponible de Sino Biological Inc., Cat. Nº 90010-CNAE), IL-1 beta de mono rhesus (por ejemplo, recombinantemente producido y disponible de R&D Systems, Cat. Nº 1318-RL/CF) y/o IL-1 beta de rata (por ejemplo, recombinantemente producido y disponible de Peprotech, Cat. Nº 400-01B).

Preferentemente, no existe actividad residual de IL-1 beta cuando se neutraliza con el anticuerpo desvelado en el presente documento en un entorno *in vivo* y/o *in vitro*, es decir, el anticuerpo inhibe completamente la acción de IL-1 beta. "Sin actividad residual", como se usa en el presente documento, se refiere a menos de 2 % de la señal del ensayo de potencia correspondiente a la liberación de IL-6 de fibroblastos humanos inducidos por 10 pg/mL de IL-1 beta, preferentemente el ensayo como se describe en el Ejemplo 3, en presencia de 60 ng/mL del anticuerpo descrito en el presente documento cuando se compara con anticuerpos de especificidad no relevante o control de vehículo a la misma concentración.

Como se ha descrito anteriormente, los fragmentos de anticuerpos monovalentes que tienen valores de potencia en el intervalo picomolar son particulares y no se obtienen rutinariamente. La potencia se correlaciona frecuentemente con el tamaño del miembro de unión: se puede obtener alta potencia en el intervalo picomolar por inmunoglobulinas de longitud completa, mientras que fragmentos muy pequeños de anticuerpos tales como nanocuerpos o unidades mínimas de reconocimiento, o pequeños armazones de no anticuerpo tales como aflinas muestran frecuentemente valores de potencia más bajos, es decir, en el intervalo nanomolar. Supuestamente, existe un mínimo para dicha función K proporcionada por scFv como se describe en el presente documento: cuanto más pequeño sea el miembro de unión, y más alta sea su potencia o afinidad monovalente, y haya más sitios de unión por molécula, más pequeña será K. Por ejemplo, para scFv como se describe en el presente documento, el límite inferior de K es igual a aproximadamente 50 ng/L mientras que el límite superior de K es igual a aproximadamente 12.500 ng/L; para las inmunoglobulinas de longitud completa respectivas, el límite inferior es igual a aproximadamente 150 ng/L y el límite K superior es igual a aproximadamente 37.500 ng/L; para otros miembros de unión que tienen pesos moleculares más pequeños que el scFv como se describe en el presente documento, el valor de K es $K > 500.000$ ng/L. En una realización preferida, el valor de K es aproximadamente 50 ng/L, 100 ng/L, 200 ng/L, 500 ng/L, 750 ng/L, 1.000 ng/L, 1.250 ng/L, 1.500 ng/L, 1.750 ng/L, 2.000 ng/L, 2.250 ng/L, o 2.500 ng/L.

Ácidos nucleicos, vectores, células hospedadoras y método de producción

Los anticuerpos descritos en el presente documento están codificados por un único ácido nucleico o por dos o más ácidos nucleicos, por ejemplo, codificando cada uno al menos una región variable. Conociendo la secuencia del anticuerpo o de sus partes, se pueden generar ADNcs que codifican la secuencia de polipéptidos por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por síntesis génica. Estos ADNcs se pueden clonar por técnicas convencionales de clonación y mutagénesis en un vector adecuado tal como un vector de expresión o un vector de clonación. Opcionalmente, la cadena ligera variable está codificada por un ácido nucleico separado distinto de la

cadena pesada variable del anticuerpo. Además, se pueden incluir en la construcción genética secuencias adicionales tales como marcadores (por ejemplo, un marcador de His), dominios constantes para la producción de un Fab o una inmunoglobulina de longitud completa, conectores, la secuencia codificante de una segunda especificidad de unión, u otro polipéptido funcional tal como una enzima para generar una construcción de fusión o una molécula biespecífica.

Basándose en la estrategia de clonación elegida, construcciones genéticas pueden generar un anticuerpo que tiene uno o más restos adicionales en el extremo N o extremo C. Por ejemplo, pueden estar presentes una metionina del extremo N derivada del codón de iniciación o una alanina adicional en un polipéptido expresado, a menos que se haya cortado postraduccionalmente. Por tanto, se debe entender que los anticuerpos desvelados en el presente documento comprenden las secuencias desveladas en vez de consistir en ellas.

Se describen protocolos básicos de técnicas convencionales de clonación, mutagénesis y biología molecular en, por ejemplo, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (GREEN, M. y Sambrook, J. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 4ª edición. Cold Spring Harbor Laboratory, 2012. ISBN 1936113422.).

Células hospedadoras apropiadas para la expresión de las construcciones genéticas pueden ser procariotas o eucariotas. Las células hospedadoras procariotas adecuadas son Gram-negativas o Gram-positivas e incluyen especies de las familias *Escherichia*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* o *Bacillus*. Es más preferida *Escherichia coli*, en particular las cepas BL21 de *E. coli* (DE3) (Life Technologies™, Cat. Nº C6000-03) y Origami™ 2(DE3) (Novagen, Cat. Nº 71345).

Si se desean modificaciones postraduccionales tales como glucosilación o fosforilación, son preferibles células hospedadoras eucariotas. Por ejemplo, microbios eucariotas tales como las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* comúnmente usadas pueden servir de células hospedadoras. Las células hospedadoras también pueden incluir células vegetales o animales, en particular células de insecto o de mamífero. Las células de mamífero adecuadas incluyen, sin estar limitadas a, células de ovario de hámster chino (CHO), células renales embrionarias humanas (HEK), células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) o células de mieloma NS0.

El anticuerpo se puede producir por expresión en una célula hospedadora adecuada. Por ejemplo, los vectores de expresión descritos anteriormente se introducen en una célula hospedadora por técnicas convencionales tales como electroporación o transformación química. Las células transformadas se cultivan entonces en condiciones adecuadas para la expresión recombinante de proteínas, normalmente en medios nutritivos apropiados, opcionalmente modificados para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar secuencias codificantes de interés. El anticuerpo se recupera del cultivo y se purifica opcionalmente usando técnicas convencionales en la técnica. El rendimiento de proteína recombinante se puede mejorar por medios de optimización y condiciones de cultivo tales como temperatura o suministro de oxígeno. En procariotas, el anticuerpo se puede producir en el periplasma, intracelularmente como cuerpos de inclusión, o se secreta en el medio. Tras la recogida, la proteína se pueden purificar usando métodos bien conocidos en esa técnica tales como filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de fase inversa, interacción hidrófoba, cromatografía en modo mixto y/o cromatografía de afinidad.

En una realización, el anticuerpo se produce en un sistema sin células. Esto implica normalmente transcripción *in vitro*, seguido por traducción *in vitro* de moldes de producto de ácido nucleico que codifican las proteínas descritas en el presente documento, por ejemplo, ADN de plásmido o moldes de producto de PCR. Por ejemplo, se usan lisados en bruto de células de crecimiento, que proporcionan las enzimas necesarias, así como la síntesis celular de la maquinaria de proteínas. Los elementos estructurales necesarios, tales como aminoácidos o nucleobases, así como moléculas de suministro de energía y otros, se pueden suministrar exógenamente. Los sistemas de expresión sin células se pueden basar, por ejemplo, en reticulocitos lisados de conejo (por ejemplo, Rabbit Reticulocyte Lysate System, Promega, Cat. Nº L4540), células HeLa (por ejemplo, 1-Step Human In Vitro Translation Kit, Thermo Scientific, Cat. Nº 88881), células de insecto (por ejemplo, EasyXpress Insect Kit II, Qiagen, Cat. Nº 32561), germen de trigo (por ejemplo, extracto de germen de trigo, Promega, Cat. Nº L4380), o células de *E. coli* (por ejemplo, PURExpress® In Vitro Protein Synthesis Kit, NEB, Cat. Nº E6800S). Por tanto, se pueden usar los sistemas de expresión de anticuerpos sin células optimizados para la mejorada generación de enlaces disulfuros para la producción. Los kits comercialmente disponibles incluyen lisados de células de insecto (por ejemplo, EasyXpress Disulfide Insect Kit, Qiagen, Cat. Nº 32582) o lisados de células de *E. coli* (por ejemplo, EasyXpress Disulfide *E. coli* Kit, Qiagen, Cat. Nº 32572). La síntesis de proteínas sin células tiene, por ejemplo, la ventaja de ser rápida, alcanzando antes rendimientos de producto, que permite la fácil modificación de condiciones de reacción, formando un bajo grado de subproductos o incluso ninguno. La síntesis de proteínas sin células puede implicar etapas biológicas y/o químicas que no se pueden realizar en sistemas de producción puramente biológicos o químicos. Por ejemplo, se pueden incorporar aminoácidos no naturales o químicamente modificados en la proteína en las posiciones deseadas. Se han producido satisfactoriamente proteínas de fusión de scFv-toxina en sistemas sin células (NICHOLLS, P. J., et al. Characterization of single-chain antibody (sFv)-toxin fusion proteins produced in vitro in rabbit reticulocyte lysate. Journal of Biological Chemistry 1993, vol. 268, pp. 5302-5308). Así, en una realización, se proporciona un método de producción del anticuerpo descrito en el presente documento, el miembro de unión anterior o el T-cuerpo anterior que comprende las etapas de (a) proporcionar un sistema sin células, (b) proporcionar un molde de producto de ácido nucleico que codifica el anticuerpo descrito en el presente documento, el miembro de

unión anterior o el T-cuerpo anterior, (c) permitir la transcripción y traducción de dicho molde de producto de ácido nucleico; (d) recuperar; y opcionalmente (e) purificar dicho anticuerpo, dicho miembro de unión o dicho T-cuerpo, respectivamente.

Adicionalmente o alternativamente, un método de producción del anticuerpo descrito en el presente documento comprende al menos una etapa de síntesis química. Por ejemplo, el método puede ser completamente químico. En otra realización, los sistemas de producción basados en células o sin células descritos anteriormente comprenden dicha al menos una etapa de síntesis química.

En una realización preferida, los anticuerpos descritos en el presente documento se producen en un sistema basado en células usando un vector de expresión para la expresión intracelular en *E. coli*. Tras la expresión, el polipéptido se genera como cuerpos de inclusión dentro de las células que se separan de partículas celulares adicionales, seguido por solubilización en un agente desnaturizante tal como clorhidrato de guanidina (GndHCl) y se repliega por procedimientos de renaturalización bien conocidos por el experto.

Se debe entender que los ácidos nucleicos, vectores, células hospedadoras y método de producción descritos anteriormente también se aplican a los miembros de unión (en tanto que sean una proteína) y/o a los T-cuerpos descritos en el presente documento.

Modificaciones químicas y/o biológicas

En un aspecto, el anticuerpo de la presente invención se modifica química y/o biológicamente. Dicha modificación puede comprender, pero no se limita a, glucosilación, PEGilación, HESilación, tecnología de fusión de albúmina, PASilación, marcado con colorantes y/o radioisótopos, conjugación con enzimas y/o toxinas, fosforilación, hidroxilación y/o sulfatación. Asimismo, se puede modificar en consecuencia cualquier miembro de unión, la secuencia de ácidos nucleicos, el vector y/o la célula hospedadora descrita anteriormente.

Se pueden realizar modificaciones químicas y/o biológicas para optimizar la farmacodinámica o solubilidad en agua de la proteína o para reducir sus efectos secundarios. Por ejemplo, se pueden aplicar PEGilación, PASilación y/o HESilación para ralentizar la depuración renal y así aumentar el tiempo de semivida en plasma del anticuerpo. Adicionalmente o alternativamente, una modificación puede añadir una funcionalidad diferente a la proteína, por ejemplo una toxina para combatir más eficientemente células cancerosas, o una molécula de detección para fines diagnósticos.

Glucosilación se refiere a un proceso que fija hidratos de carbono a proteínas. En sistemas biológicos, este proceso se realiza enzimáticamente dentro de la célula como una forma de modificación cotraduccional y/o postraduccional. Una proteína, aquí el anticuerpo, también puede estar químicamente glucosilada. Normalmente, pero no se limita a, la glucosilación es (i) N-ligada a un nitrógeno de asparagina o cadenas laterales de arginina; (ii) O-ligada al oxígeno de hidroxilo de serina, treonina, tirosina, hidroxilisina, o cadenas laterales de hidroxiprolina; (iii) implica la unión de xilosa, fucosa, manosa y N-acetilglucosamina a una fosfoserina; o (iv) en forma de C-manosilación en donde se añade un azúcar de manosa a un resto de triptófano encontrado en una secuencia de reconocimiento específica. Los patrones de glucosilación se pueden controlar, por ejemplo, eligiendo líneas celulares apropiadas, medios de cultivo, modos de fabricación por manipulación de proteínas y estrategias de proceso (HOSSLER, P. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology* 2009, vol. 19, no. 9, p. 936-949).

La manipulación de proteínas para controlar o alterar el patrón de glucosilación puede implicar la delección y/o adición de uno o más sitios de glucosilación. La creación de sitios de glucosilación se puede llevar a cabo convenientemente introduciendo la secuencia enzimática de reconocimiento correspondiente en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o añadiendo o sustituyendo uno o más de los restos de aminoácidos enumerados anteriormente.

Puede desearse PEGilar el anticuerpo. La PEGilación puede alterar las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas de una proteína. Se fija covalentemente polietilenglicol (PEG) de un peso molecular apropiado al esqueleto de proteína (véase, por ejemplo, PASUT, G. y Veronese, F. State of the art in PEGylation: the great versatility achieved after forty years of research. *Journal of Controlled Release* 2012, vol. 161, no. 2, p. 461-472). La PEGilación puede reducir adicionalmente la inmunogenicidad escudando la proteína PEGilada del sistema inmunitario y/o alterando su farmacocinética, por ejemplo, aumentando la estabilidad *in vivo* del anticuerpo, protegiéndolo de la degradación proteolítica, prolongando su tiempo de semivida y alterando su biodistribución.

Se pueden lograr efectos similares por miméticos de PEG, por ejemplo, HESilando o PASilando el anticuerpo. La HESilación utiliza derivados de hidroxietilalmidón ("HES"), mientras que durante la PASilación el anticuerpo se une a secuencias de polipéptidos conformacionalmente alteradas compuestas de los aminoácidos prolina, alanina y serina. Dichos miméticos de PEG y compuestos relacionados se describen, por ejemplo, en BINDER, U. y Skerra, A. Half-Life Extension of Therapeutic Proteins via Genetic Fusion to Recombinant PEG Mimetics, en *Therapeutic Proteins: Strategies to Modulate Their Plasma Half-Lives*. Editado por KONTERMANN, R., Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2012. ISBN: 9783527328499. p. 63-81.

El anticuerpo puede incluir un epítipo y en particular un epítipo de unión a receptor de rescate. Dicho epítipo de unión a receptor de rescate se refiere normalmente a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4) y tiene el efecto de aumentar la semivida *in vivo* de la molécula.

Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo está marcado con o conjugado con un segundo resto que asigna funciones complementarias tras la unión a diana. Dicho segundo resto puede tener, por ejemplo, una función efectora inmunológica adicional, ser eficaz en el direccionamiento de fármacos o útil para la detección. El segundo resto, por ejemplo, se puede enlazar químicamente o fusionar genéticamente con el anticuerpo usando métodos conocidos en la materia.

Las moléculas que pueden servir como segundo resto incluyen, sin estar limitadas a, radionúclidos, también denominados radioisótopos (por ejemplo, ^{35}S , ^{32}P , ^{14}C , ^{18}F , ^{125}I); apoenzimas; enzimas (tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa o angiogenina); co-factores; péptidos (por ejemplo, marcadores de HIS); proteínas (incluidas lectinas); hidratos de carbono (incluidos marcador de manosa-6-fosfato); fluoróforos (incluyendo isotiocianato de fluoresceína (FITC); ficoeritrina; proteínas verdes / azules / rojas y otras proteínas fluorescentes; alofocianina (APC)); cromóforos; vitaminas (incluyendo biotina); quelantes; antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato), liposomas; toxinas que incluyen fármacos citotóxicos tales como taxol, gramicidina D o colchicina; o una radiotoxina.

Un anticuerpo marcado es particularmente útil para la detección *in vitro* e *in vivo* o fines de diagnóstico. Por ejemplo, se puede detectar un anticuerpo marcado con un radioisótopo, enzima, fluoróforo o cromóforo adecuado por radioinmunoensayo (RIA), enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), o análisis de células individuales basado en citometría de flujo (por ejemplo, análisis de FACS), respectivamente. Similarmente, se pueden usar los ácidos nucleicos y/o vectores desvelados en el presente documento para fines de detección o diagnóstico, por ejemplo usando fragmentos marcados de los mismos como sondas en ensayos de hibridación. Los protocolos de marcado se pueden encontrar, por ejemplo, en JOHNSON, I. y Spence, M. T.Z. Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. Life Technologies, 2010. ISBN: 0982927916.

25 Composiciones

El anticuerpo de la presente invención, cualquier miembro de unión, las secuencias de ácidos nucleicos o el vector desvelado en el presente documento, se pueden proporcionar en una composición que comprende además un vehículo, excipiente o diluyente adecuado. Es más preferida una composición que comprende un anticuerpo descrito en el presente documento.

Dicha composición puede, por ejemplo, ser una composición de diagnóstico, cosmética, o una farmacéutica. Para fines terapéuticos o cosméticos, dicha composición es una composición farmacéutica que comprende un vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico, es decir, que no es tóxico a las dosificaciones y una concentración empleada.

Los "vehículos", "excipientes" o "diluyentes" adecuados incluyen, sin estar limitados a: (i) tampones tales como fosfato, citrato, u otros, ácidos orgánicos; (ii) antioxidantes tales como ácido ascórbico y tocoferol; (iii) conservantes tales como 3-pentanol, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, alcohol bencílico, alquilparabeno, catecol, o ciclohexanol; (iv) aminoácidos, tales como, por ejemplo, histidina, arginina; (v) péptidos, preferentemente hasta 10 restos tales como polilisina; (vi) proteínas, tales como albúmina de suero bovino o humano; (vii) polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; (viii) monosacáridos, disacáridos, polisacáridos y/u otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa, sacarosa, manitol, trehalosa, sorbitol, aminodextrano o poliamidaminas; (ix) agentes quelantes, por ejemplo EDTA; (x) iones formadores de sal tales como sodio; (xi) complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o (xii) tensioactivos iónicos y no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

Muchos de dichos compuestos a modo de ejemplo tienen diferentes funciones y pueden actuar, por ejemplo, como vehículo y como diluyente. También se debe entender que la composición puede comprender más de uno de cada vehículo, diluyente o excipiente.

El anticuerpo, el miembro de unión, las secuencias de ácidos nucleicos o el vector se pueden proporcionar sobre materiales de soporte sólido tales como perlas y micropartículas. Normalmente, las moléculas se enlazan a dicho vehículo por un enlace covalente (opcionalmente que implica un conector), no covalentemente o mezcla. Dichas perlas y micropartículas pueden comprender, por ejemplo, almidón, celulosa, poliacrilato, polilactato-poliglicolato, poli(lactida-co-glicolida), látex, o dextrano.

Aplicaciones terapéuticas

Las moléculas descritas en el presente documento, en particular el anticuerpo, miembro de unión, ácido nucleico o vector, son útiles como un medicamento. Normalmente, dicho medicamento comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de las moléculas proporcionadas en el presente documento. Por consiguiente, dichas moléculas se pueden usar para la producción de un medicamento útil en el tratamiento de trastornos relacionados con IL-1 beta.

En un aspecto, se proporciona un método de tratamiento de un trastorno relacionado con IL-1 beta que comprende las etapas de administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de las moléculas descritas en el presente documento, en particular el anticuerpo, a un sujeto en necesidad del mismo. En una realización, la composición farmacéutica anterior (es decir, medicamento) que comprende dicha cantidad farmacéuticamente eficaz del anticuerpo se administra a dicho sujeto.

El término "tratar" o "tratamiento", como se usa en el presente documento, se refiere a la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz del anticuerpo, miembro de unión, ácido nucleico, vector o célula hospedadora de la presente invención, a un sujeto en necesidad del mismo para prevenir, curar, retrasar la aparición y/o progresión, reducir la gravedad de, estabilizar, modular, curar o mejorar uno o más síntomas de un trastorno relacionado con IL-1 beta. Normalmente, el anticuerpo, miembro de unión, ácido nucleico, vector o célula hospedadora se proporciona en una composición farmacéutica que incluye las previamente descritas en el presente documento.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que a la pauta posológica aplicada da el efecto terapéutico deseado, es decir, para alcanzar los objetivos de tratamiento como se han definido anteriormente. La dosificación dependerá de diversos factores que incluyen factores del paciente y clínicos (por ejemplo, edad, peso, sexo, historia clínica del paciente, gravedad del trastorno y/o respuesta al tratamiento), la naturaleza del trastorno que está tratándose, la composición particular a administrar, la vía de administración, y otros factores.

El sujeto en necesidad de tal tratamiento puede ser un animal humano o no humano, por ejemplo, un ratón, rata, conejo, mono, perro, caballo, vaca, pollo, cobaya o cerdo. Normalmente, el sujeto se diagnostica con un trastorno relacionado con IL-1 beta o puede adquirir dicho trastorno.

Los ejemplos de trastornos relacionados con IL-1 beta, en los que el antagonista de IL-1 beta ha mostrado efectos terapéuticos, incluyen, sin estar limitados a, retinopatía diabética proliferativa, artritis gotosa, síndrome de Schnitzler, artritis juvenil idiopática sistémica, artritis reumatoide, artritis gotosa aguda, artritis gotosa crónica, urticaria, vasculitis, diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, espondilitis anquilosante, osteomielitis multifocal recurrente, policondritis recidivante, síndrome periódico asociado a la ciropinina (CAPS), enfermedad de Behçet, fiebre mediterránea familiar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, polimialgia reumática, mutaciones NALP3, pioderma gangrenoso, urticaria idiopática crónica, osteoartritis, degeneración macular senil húmeda, síndrome del ojo seco, psoriasis pustular, síndrome de sinovitis-acné-pustulosis-hiperostosis-osteítis, síndrome de activación de macrófagos, síndrome de fiebre periódica-adenitis-faringitis-úlceras aftosas, enfermedad de Still del adulto, deficiencia de mevalonato cinasa, aterosclerosis, síndrome periódico asociado al receptor de TNF (TRAPS), acné vulgar y/o acné inversa.

Se debe entender que el término "CAPS" o síndrome periódico asociado a la ciropinina incluye cada uno del síndrome autoinflamatorio familiar inducido por el frío (FCAS), síndrome de Muckle-Wells (MWS) y enfermedad inflamatoria multisistémica de inicio neonatal, también conocido como síndrome articular, cutáneo y neurológico crónico infantil (CINCA).

La composición farmacéutica se puede aplicar por diferentes vías de administración. La administración se puede realizar, por ejemplo, pero no se limita a, por vía parenteral, por ejemplo, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intravenosa como un bolo o por infusión continua, por vía intrarticular, por vía intrasnovial, por vía intracerebral, por vía intracerebroespinal, por vía intratecal, por vía epidural o por vía intraperitoneal; por vía oral; por vía rectal; por vía local, por vía urogenital; por vía tópica, por ejemplo, a la piel o al ojo; por vía intravítrea; por vía intravenosa; por vía intraocular; por vía ótica; por vía intranasal; por inhalación; por vía dérmica tal como por vía intradérmica, por vía subcutánea o por vía transdérmica; por vía sublingual; por vía bucal, por ejemplo. Se prefieren las vías de administración tópica, rectal, local, intranasal, intravenosa y/o intradérmica.

El anticuerpo de la presente invención, el miembro de unión, las secuencias de ácidos nucleicos, el vector o célula hospedadora se pueden combinar con uno o más compuestos terapéuticamente eficaces adicionales. Dicho compuesto puede o ser capaz de alterar la señalización por el receptor de IL-1, o alternativamente inhibir una o más dianas diferentes, tales como, por ejemplo, otros mediadores de respuestas inflamatorias. Dicho(s) compuesto(s) se pueden administrar simultánea o secuencialmente.

Para aplicaciones terapéuticas, el anticuerpo también se puede radiomarcarse o unir a una toxina o unir a otra función efectora como se ha descrito anterior.

Aplicaciones de diagnóstico y/o fines de detección

El anticuerpo de la presente invención se puede usar para fines de detección o diagnóstico *in vivo* y/o *in vitro*. Por ejemplo, el experto conoce una amplia variedad de inmunoensayos que implican anticuerpos para detectar la expresión en células o tejidos específicos. Asimismo, se puede usar cualquier miembro de unión, secuencia de ácidos nucleicos, vector y/o célula hospedadora descrita previamente en consecuencia como se detalló en esta sección.

Para dichas aplicaciones, el anticuerpo, miembro de unión, la secuencia de ácidos nucleicos, el vector o la célula hospedadora desvelados en el presente documento pueden estar o marcados o sin marcar. Por ejemplo, se puede

usar un anticuerpo no marcado y se detecta por un anticuerpo secundario que reconoce un epítoto sobre el anticuerpo descrito en el presente documento.

5 En otra realización, el anticuerpo, miembro de unión, secuencia de ácidos nucleicos, vector y/o célula hospedadora se conjuga con una o más sustancias que se pueden reconocer por una sustancia(s) detectora(s), por ejemplo, el anticuerpo que se conjuga con biotina que se puede detectar por estreptavidina. Asimismo, los ácidos nucleicos y/o vectores desvelados en el presente documento se pueden usar para fines de detección o diagnóstico, por ejemplo, usando fragmentos marcados de los mismos como sondas en ensayos de hibridación.

10 En ciertas realizaciones, cualquiera de las moléculas proporcionadas en el presente documento, en particular el anticuerpo, es útil para detectar la presencia de IL-1 beta, preferentemente que incluye IL-1 beta de longitud completa, fragmentos de los mismos y/o precursores de los mismos, en una muestra, preferentemente muestra biológica. El término "detectar" engloba detección cuantitativa y/o cualitativa. En ciertas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o tejido de pacientes humanos. Los ejemplos no limitantes de muestras biológicas incluyen sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, biopsia, linfa y/o tejidos no sanguíneos.

15 En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-IL-1 beta como se describe en el presente documento en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo a IL-1 beta, si está presente, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo e IL-1 beta. Dicho método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En una realización, se usa un anticuerpo anti-IL-1 beta para seleccionar sujetos elegibles para terapia con el anticuerpo descrito en el presente documento, por ejemplo, donde IL-1 beta es un biomarcador para la selección de pacientes. Similarmente, en lugar del anticuerpo, dicho método puede implicar el uso del
20 miembro de unión anterior o un T-cuerpo descrito en el presente documento.

En otro aspecto, el anticuerpo se usa en aplicaciones cosméticas, por ejemplo, para mejorar el aspecto estético de la piel.

25 En un aspecto adicional, se proporciona un kit que comprende el anticuerpo, una combinación envasada de reactivos con instrucciones para realizar el ensayo de detección o diagnóstico. Los reactivos normalmente se proporcionan en cantidades predeterminadas de polvos secos, normalmente liofilizados, que incluyen excipientes que después de la disolución proporcionarán una disolución de reactivo que tiene la concentración apropiada. También se pueden incluir otros aditivos tales como estabilizadores y/o tampones. Si el anticuerpo se marca con una enzima, el kit normalmente incluirá los sustratos y cofactores acordes. Asimismo, cualquier miembro de unión, secuencia de ácidos nucleicos, vector y/o célula hospedadora descrito previamente se puede usar en consecuencia
30 como se detalló en esta sección.

Listado de secuencias

Las secuencias desveladas en el presente documento son:

SEQ ID NO: 1 - VH CDR1

FSLSSAAMA

35 SEQ ID NO: 2 - VH CDR2

IIYDSASTYYASWAKG

SEQ ID NO: 3 - VH CDR3

ERAIFSGDFVL

SEQ ID NO: 4 - VL CDR1

40 QASQSIDNWLS

SEQ ID NO: 5 - VL CDR2

RASTLAS

SEQ ID NO: 6-VL CDR3

QNTGGGVSLA

SEQ ID No: 7 – VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGLEWVGIYDSAST
YYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARERAIFSGDFVLWGQGT
LTVSS

SEQ ID No: 8 – VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVP
SRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFAFYTCQNTGGGVSIATFGQGTCLTVLG

SEQ ID NO: 9 - conector

GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS

SEQ ID No: 10 – DLX2323

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVP
SRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFAFYTCQNTGGGVSIATFGQGTCLTVLGGGGGSGG
GGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPG
KGLEWVGIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARERA
IFSGDFVLWGQGTCLTVSS

5

SEQ ID No: 17 - Secuencia de ADN de DLX2323

GAAATTGTTATGACCCAGAGCCCGAGCACCTGAGCGCAAGCGTTGGTGATCGTG
TGATTATTACCTGTCAGGCAAGCCAGAGCATTGATAATTGGCTGAGCTGGTATCAG
CAGAAACCGGGTAAAGCACCGAACTGCTGATTTATCGTGCAAGCACCTGGCAA
GCGGTGTTCCGAGCCGTTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGTGCAAAATTTACCTGAC
CATTAGCAGCCTGCAGCCGGATGATTTTGCAACCTATTATTGTCAGAATACCGGTG
GTGGTGTTAGCATTGCAATTTGGTCAGGGCACCAAACTGACCGTTCTGGGTGGTGG
CGGTGGATCCGGTGGGGGTGGTAGCGGAGGTGGTGGTTCAGGCGGTGGTGGCA
GCGAAGTTCAGCTGGTTGAAAGTGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCTGGTGGTAGCCT
GCGTCTGAGCTGTACCGCAAGCGGTTTTAGCCTGAGCAGCGCAGCAATGGCATGG
GTTCTGTCAGGCACCTGGTAAAGTCTGGAATGGGTTGGTATTATCTATGATAGCGC
AAGCACCTATTATGCAAGCTGGGCAAAAGGTCGTTTTACCATTAGCCGTGATACCA
GTAAAAATACCGTTTACCTGCAGATGAATAGTCTGCGTGCAGAGGATACCGCAGTG
TATTATTGTGCACGTGAACGTGCAATTTTCAGCGGTGATTTTGTTCTGTGGGGTCA
GGGAACCCTGGTTACCGTTAGCAGC

SEQ ID NO: 18 - FR-L1 de FW1.4

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC

SEQ ID NO: 19 - FR-L2 de FW1.4

WYQQKPGKAPKLLIY

SEQ ID NO: 20 - FR-L3 de FW1.4

GVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFA TYYC

10

SEQ ID NO: 21 - FR-L4 de FW1.4
 FGQGTKL TVLG
 SEQ ID NO: 22 - FR-H1 de rFW1.4
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASG
 5 SEQ ID NO: 23 - FR-H2 de rFW1.4
 WVRQAPGKGLEWVG
 SEQ ID NO: 24 - FR-H3 de rFW1.4
 RFTISRDTSKNTVILQMNSLRAEDTAVYYCAR
 SEQ ID NO: 25 - FR-H4 de rFW1.4
 10 WGQGTTLVTSS
 SEQ ID NO: 26 - FR-H1 de rFW1.4(V2)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSG
 SEQ ID NO: 27 - FR-H2 de rFW1.4(V2)
 WVRQAPGKGLEWVG
 15 SEQ ID NO: 28 - FR-H3 de rFW1.4(V2)
 RFTISKDTSKNTVILQMNSLRAEDTAVYYCAR
 SEQ ID NO: 29 - FR-H4 de rFW1.4(V2)
 WGQGTTLVTSS
 SEQ ID NO: 30 - FR-H1 de rFW1.4-SST
 20 EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASG
 SEQ ID NO: 31 - FR-H2 de rFW1.4-SST
 WVRQAPGKGLEWVG
 SEQ ID NO: 32 - FR-H3 de rFW1.4-SST
 RFTISRDTSKNTVILQMNSLRAEDTASYCAR
 25 SEQ ID NO: 33 - FR-H4 de rFW1.4-SST
 WGQGTTLVTSS

Ejemplos

Ejemplo 1 - Identificación de scFv neutralizante de rhIL-1 beta

30 Inmunización de conejos: Se inmunizaron conejos con proteína IL-1 beta humana recombinante (Peprotech, EE. UU., Cat. N° 200-01B). Se aislaron células de ganglios linfáticos y del bazo después del refuerzo final y se criopreservaron.

Clasificación por citometría de flujo de linfocitos B de conejo y cultivo: Se clasificaron linfocitos B de memoria específicos de IL-1 beta como células individuales en microplacas de 96 pocillos usando FACSaria III (BD Biosciences). Se cultivaron clones de linfocitos B individuales en presencia de células nodrizas.

35 Cribado de clones de linfocitos B: Se analizaron por ELISA sobrenadantes de cultivo celular para la presencia de IgGs específicas de anti-IL-1 beta. Brevemente, se recubrió rhIL-1 beta (Peprotech, Cat. N° 200-01B) a una concentración de 2 mcg/mL durante la noche a 4 °C sobre microplacas de 96 pocillos Maxisorp en PBS. Después de bloquear con 5 % de leche desnatada en polvo, se añadieron sobrenadantes de cultivo celular. Se detectaron IgGs específicas de IL-1 beta por IgG-HRP anti-conejo (Southern Biotech, Cat. N° 4050-05). El ELISA se desarrolló con sustrato BM Blue POD (Roche Applied Science). Se analizaron adicionalmente clones de linfocitos B específicos

40 para rhIL-1 beta para su capacidad de neutralización en un ensayo de fibroblastos humanos.

Secuenciación de IgGs neutralizantes de IL-1 beta: Se sometieron todos los clones de linfocitos B de conejo que producen anticuerpos anti-IL-1 beta neutralizantes a aislamiento de ARNm usando el kit RNeasy Mini (Qiagen Germany, Cat. Nº 74106). Se usó ARNm como molde para la transcripción inversa según el protocolo del fabricante (kit de RT-PCR OneStep, Qiagen Germany, Cat. Nº 210212). Posteriormente, se llevaron a cabo reacciones de PCR usando oligonucleótidos para amplificar específicamente secuencias codificantes de la cadena pesada y ligera de IgG de conejo (termociclador Biometra T3). Se secuenciaron independientemente fragmentos de PCR de la cadena pesada y ligera (ABI, Sanger 3730x1; Microsynth AG, Balgach, Suiza), y se tradujeron las secuencias de ADN obtenidas en secuencias de proteínas usando EMBOSS Transeq (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/>) y se alinearon usando CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Construcción de genes de scFv anti-IL-1 beta, y expresión de proteínas scFv: Se identificaron regiones de IgG de conejo CDR de las cadenas ligeras y las pesadas como se han definido anteriormente y se injertaron en las regiones estructurales aceptoras de cadena ligera y pesada humana que comprenden SEQ ID NOs: 18-21 y 22-25, respectivamente. Se generaron vectores de expresión bacterianos que codifican proteínas scFv con la cadena ligera variable del extremo N unida por la secuencia SEQ ID NO: 9 a la cadena pesada variable del extremo C. Se expresaron las proteínas scFv en BL21 de *E. coli* (DE3); Novagen, EE. UU., Cat. Nº 69450-3) como cuerpos de inclusión, que se purificaron, se solubilizaron y se replegaron las proteínas. Los scFvs replegados se purificaron por cromatografía de exclusión por tamaño estándar y se recogieron fracciones de picos monoméricos. Se analizaron scFvs purificadas para la unión de IL-1 beta por ELISA. Se probaron scFv que se encontró que se unieron específicamente a rhIL-1 beta para la neutralización de IL-1 beta en un ensayo de fibroblastos humanos. Por este procedimiento, se identificaron scFv DLX2323 y otros scFvs anti-IL-1 beta como potentes inhibidores de IL-1 beta.

Ejemplo 2 - Reconocimiento de IL-1 beta humana

En primer lugar, se confirmó por ELISA el reconocimiento específico de rhIL-1 beta por DLX2323 (Figura 1). Brevemente, se recubrió rhIL-1 beta (Peprotech, Cat. Nº 200-01B) a una concentración de 2 mcg/mL durante la noche a 4 °C sobre microplacas de 96 pocillos Maxisorp en PBS. Después de bloquear con 5 % de leche desnatada en polvo, se añadieron concentraciones crecientes de scFvs (10 a 300 ng/mL), y se detectaron scFvs por Protein L-HRP (Sigma-Aldrich, Cat. Nº P3226). El ELISA se desarrolló con sustrato BM Blue POD (Roche Applied Science). Como control negativo, se usó scFv de especificidad irrelevante. Este resultado muestra que DLX2323 se une específicamente a rhIL-1beta.

Para confirmar que DLX2323 y el scFv de control fueron reconocidos por Protein L-HRP y, así, que una ausencia de la señal para unión de rhIL-1 beta en el ELISA anterior no fue debida a un problema de detección, se realizó otro experimento. Los scFvs se recubrieron directamente sobre la placa y se detectaron por Protein L-HRP como se ha descrito anteriormente. Todos los scFvs se recubrieron a una concentración de 2 mcg/mL en PBS. Este experimento de ELISA mostró que DLX2323 y el scFv de control son reconocidos por el agente de detección por Protein L-HRP.

En otro ELISA (Figura 2), se confirmó el reconocimiento de IL-1 beta natural humana por DLX2323. Como se conoce comúnmente, la expresión de proteínas humanas en células distintas de células humanas podría provocar cambios, por ejemplo, en modificaciones postraduccionales y/o conformación. Esto podría conducir a un reconocimiento diferencial de proteínas recombinantes y naturales por anticuerpos. Se secretó IL-1 beta humana natural por células THP-1 (DSMZ Germany, Cat. Nº ACC 16) después de la estimulación con 10 ng/mL de PMA (Sigma-Aldrich, Cat. Nº P1585), 1 mg/mL de LPS (Sigma-Aldrich, Cat. Nº L4391) y 2 mM de ATP (Sigma-Aldrich, Cat. Nº A6559-25UMO). Se recogieron los sobrenadantes de células y se cuantificó IL-1 beta natural humana secretada usando Human IL-1 beta/IL-1F2 ELISA DuoSet (R&D Systems, Cat. Nº DY201). Se recubrió DLX2323 sobre microplacas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) a una densidad de recubrimiento de 5 mcg/mL en DPBS (pH 7,4). Se aplicaron IL-1 beta humana o como versión recombinantemente expresada (Peprotech, Cat. Nº 200-01B) o como versión nativamente secretada a concentraciones finales que variaron desde 0,5 hasta 4 ng/mL. Se detectó IL-1 beta unida por un anticuerpo anti-hIL-1 beta de cabra biotinilado (R&D Systems, Cat. Nº DY201) y estreptavidina-HRP (BD Pharmingen, Cat. Nº 554060). El ELISA se desarrolló usando el sustrato BM Blue POD (Roche Applied Science). Para fines de cuantificación, la absorbancia se midió a 450 nm usando un lector de microplacas VersaMax (Molecular Devices, EE. UU.). El resultado (véase la Figura 2) muestra que ambas, IL-1 beta humana recombinante y natural, son reconocidas por DLX2323 a niveles comparables.

Ejemplo 3 - Neutralización de la actividad biológica de rhIL-1 beta

Se probaron anticuerpos y scFvs para su capacidad de neutralización de IL-1 beta en un ensayo de fibroblastos dérmicos humanos (NHDF-Neo, Cat. Nº CC-2509, Lonza Walkersville EE. UU.). La activación de dichos fibroblastos con IL-1 beta conduce a la liberación de IL-6 específica que se cuantifica por ELISA. La inhibición de IL-1 beta por anticuerpos específicos disminuye la cantidad de IL-6 liberada de dichos fibroblastos. La potencia inhibidora del anticuerpo anti-IL-1 beta se cuantifica midiendo la reducción al 50 % (CI₅₀) de la liberación de IL-6 inducida por IL-1 beta. Se sembraron fibroblastos dérmicos humanos en microplacas de 96 pocillos a 5.000 células/pocillo 16-20 horas antes de la adición de IL-1 beta. Los fibroblastos se cultivaron en medio basal de fibroblastos (FBM; Lonza, Cat. Nº CC-3131) con suplementos (hFGF-B, insulina, FBS, GA-1000) como se describe por el proveedor de células (Lonza Walkersville EE. UU.: Clonetics™ Dermal Fibroblast Cell Systems). Entonces se retiró FBM y las células se lavaron una vez con medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco, Life Technologies, Cat. Nº 11880) para

retirar factores de crecimiento. Entonces se incubaron las células durante 7 horas en medio DMEM. Se preincubaron los anticuerpos o scFvs y rhIL-1 beta en DMEM durante 1 hora a 37 °C. La mezcla se añadió a las células a una concentración final de 10 pg/mL de IL-1 beta. Como control negativo, se añadieron 10 pg/mL de IL-1 beta a las células sin ningún anticuerpo anti-IL-1 beta. Como control positivo, se aplicó un anticuerpo monoclonal de ratón contra IL-1 beta (R&D Systems, EE. UU., Cat. N° MAB201). Las células se incubaron con la mezcla de anticuerpos IL-1 beta / anti-IL-1 beta durante 18-24 horas, y se analizaron los sobrenadantes de cultivo celular para la liberación de IL-6 usando el kit de ELISA Human IL-6 DuoSet según las instrucciones del fabricante (R&D Systems, EE. UU., Cat. N° DY206).

Se determinó que la CI_{50} de DLX2323 era 3 pM $\pm$ 1,05 en ocho ensayos independientes.

10 **Ejemplo 4 - Comparación de la potencia de neutralización con inhibidores de IL-1 beta comercialmente disponibles**

Se identificó DLX2323 como un scFv neutralizante de IL-1 beta. Se evaluó la potencia biológica de DLX2323 y otros inhibidores en el ensayo de fibroblastos dérmicos humanos como se describe en el Ejemplo 3. Se preincubó IL-1 beta humana recombinante con concentraciones crecientes del scFv DLX2323, el anticuerpo IgG monoclonal anti-IL-1 beta humana MAB201, el antagonista del receptor de IL-1 beta (rhIL-1ra) (R&D Systems, Cat. N° 280-RA-010/CF) o la IgG comercializada autorizada por la FDA canakinumab (Novartis, Ilaris®) antes de la adición a los pocillos. Se realizaron dos experimentos independientes: la Figura 3A representa la comparación de DLX2323 con MAB201, mientras que la Figura 3B muestra la comparación de DLX2323 con rhIL-1ra y canakinumab. Se determinaron los siguientes valores de CI_{50} : MAB201: 2-3 pM; DLX2323: 2-4 pM; rhIL-1ra: 40 pM y canakinumab: 90 pM. En conclusión, el scFv monomérico monovalente DLX2323 es casi tan potente como el anticuerpo monoclonal de ratón bivalente MAB201. Muestra potencia claramente más alta en neutralizar IL-1 beta humana que el inhibidor comercializado canakinumab y el rhIL-1ra. Además, DLX2323 podría bloquear completamente la liberación de IL-6 inducida por IL-1 beta.

Ejemplo 5 - Solubilidad

Se almacenó DLX2323 en tampón PBS a pH 7,2 (solución salina tamponada con fosfato 1X, Gibco, Life Technologies™, Cat. N° 20012). Para determinar su solubilidad máxima, se concentró DLX2323 usando concentradores de centrifugadora Vivaspin 20 (Sartorius Stedim Biotech, Cat. N° VS2001) a temperatura ambiente. El proceso de concentración se detuvo a 71 mg/mL debido a la alta viscosidad de la muestra. La disolución de proteína DLX2323 obtenida fue viscosa, clara y no se observaron precipitados por inspección visual.

30 **Ejemplo 6 - Estabilidad**

Con respecto a la estabilidad de scFvs, se pueden observar dos procesos diferentes que contribuyen a su inestabilidad. En primer lugar, el scFv podría ser propenso a la dimerización, frecuentemente seguido por oligomerización y con el tiempo agregación. En segundo lugar, la degradación de scFv, que conduce a fragmentos más pequeños, puede ocurrir con el tiempo. Para determinar si DLX2323 es estable, se empleó cromatografía de exclusión por tamaño HPLC (Dionex, Summit system) (Tosoh, TSKgel G2000SWxl, Cat. N° 08540) para determinar el porcentaje de proteína scFv monomérica no degradada en ciertos puntos de tiempo a diferentes concentraciones de proteína y temperaturas (por ejemplo, 4 °C, TA y 37 °C). Se midió el porcentaje de monómero en el punto de partida del estudio (T0) y después de un mes durante 1 mg/mL de DLX2323, y, en otro experimento, después de dos semanas para una disolución 50 mg/mL de DLX2323. La proteína se formuló en PBS, pH 7,2. Los resultados del estudio de estabilidad se enumeran en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1

	Contenido de monómero después de 1 mes	Observación
DLX2323, 1 mg/mL, T0	97 %	
DLX2323, 1 mg/mL, almacenado a TA	98 %	
DLX2323, 1 mg/mL, almacenado a 37 °C	93 %	Niveles muy bajos de degradación

Tabla 2

	Contenido de monómero después de 2 semanas	Observaciones
DLX2323, 50 mg/mL, T0	97 %	
DLX2323, 50 mg/mL, almacenado a 4 °C	78 %	dimerización
DLX2323, 50 mg/mL, almacenado a TA	76 %	oligomerización
DLX2323, 50 mg/mL, almacenado a 37 °C	43 %	oligomerización

Se evaluó la estabilidad térmica de DLX2323 por fluorimetría diferencial de barrido (DSF). Para esta medición, un dispositivo de PCR en tiempo real (Corbett, Rotor-Gene) calentó DLX2323 en un gradiente de temperatura desde 30 °C hasta 95 °C (elevando en etapas de 1 °C, esperando 5 segundos por etapa). La muestra de proteína contuvo 0,5 mg/mL de DLX2323 y 20x SYPRO® Orange (Sigma-Aldrich, Cat. Nº S5692, 5000x) en PBS. Tan pronto como la proteína empezó a fundirse, Sypro Orange viró a fluorescente. Esta fluorescencia se midió en línea (longitud de onda de excitación de 470 nm; longitud de onda de emisión de 555 nm) durante la serie de gradientes. Usando Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7 se calculó que la temperatura de fusión en el punto medio (T_m) de DLX2323 era 74 °C.

Ejemplo 7 - Reactividad cruzada

Se evaluó en ELISA la reactividad cruzada de DLX2323 con homólogos de IL-1 beta de otras especies distintas de seres humanos. Se investigó la unión a las proteínas IL-1 beta recombinantemente expresadas de las siguientes especies: cinomolgo (Sino Biological Inc., EE. UU., Cat. Nº 90010-CNAE), macaco Rhesus (R&D Systems, EE. UU., Cat. Nº 1318-RL/CF), cerdo (Kingfisher Biotech, EE. UU., Cat. Nº RP0297S-025), canino (Kingfisher Biotech, EE. UU., Cat. Nº RP0085D-025), cobaya (Kingfisher Biotech, Cat. Nº RP0343GP-025), rata (Peprotech, Cat. Nº 400-01B) y ratón (BioLegend, Cat. Nº 575102). Se comparó la unión de DLX2323 a anticuerpos de control positivo por ELISA (R&D Systems, EE. UU., IgG policlonal de cabra anti-IL-1 beta humana, Cat. Nº AB-201-NA; BioLegend, Inc., EE. UU., anticuerpo biotina anti-ratón / rata IL-1 beta, Cat. Nº 503505). Brevemente, se recubrieron proteínas a una concentración de 2 mcg/mL durante la noche a 4 °C sobre microplacas de 96 pocillos Maxisorp en PBS. Después de bloquear con 5 % de leche desnatada en polvo, se añadieron concentraciones crecientes (0,1 mcg/mL, 0,3 mcg/mL y 1,0 mcg/mL) de DLX2323 a los pocillos. Se confirmó por separado el recubrimiento satisfactorio de cada proteína explotando los anticuerpos de control específicos de IL-1 beta. Aunque se detectó DLX2323 por Protein L-HRP (Sigma-Aldrich, EE. UU., Cat. Nº P3226), los anticuerpos de control se detectaron por o estreptavidina-HRP (BD Pharmingen, EE. UU., Cat. Nº 554060) u otros anticuerpos secundarios elegibles marcados con HRP. El ELISA se desarrolló con el sustrato BM Blue POD (Roche Applied Science) y la absorbancia se midió a 450 nm. DLX2323 reconoció cuatro ortólogos de especies de IL-1 beta, concretamente IL-1 beta humana, de cinomolgo, macaco rhesus y de rata. No se pudo observar reactividad cruzada para IL-1 beta porcina, de cobaya, canina y de ratón.

Además de la reactividad cruzada de DLX2323 con homólogos de IL-1 beta de otras especies distintas de seres humanos, se midió el patrón de reconocimiento de DLX2323 referente a diversos miembros de la familia de IL-1 humana y otras citocinas: rhIL-1ra (R&D Systems, EE. UU., Cat. Nº 280-RA-010/CF), rhIL-1 alfa (PeproTech, Cat. Nº 200-01A), rhIL-18 (BioVision, Cat. Nº 4179-25), rhIL-33 (Peprotech, Cat. Nº 200-33), IL-36ra (R&D Systems, Cat. Nº 1275-IL/CF), rhTNF alfa (Peprotech, Hamburgo, Alemania Cat. Nº 300-01A) y rhIL-6 (Peprotech, Cat. Nº 200-06). En el ensayo de ELISA aplicado, los siguientes anticuerpos sirvieron de controles positivos: biotina anti-IL-1ra humana (BioLegend, Cat. Nº 509501), biotina anti-IL-1 alfa humana (BioLegend, Cat. Nº 515703), anticuerpo policlonal anti-IL-18 humana (BioVision, Cat. Nº 5179-100), anticuerpo biotina anti-IL-33 humana (Peprotech, Cat. Nº 500-P261 Bt), scFv anti-TNF alfa humana DLX105 (anticuerpo patentado de Delenex descrito en el documento de patente WO 2006/131013 A), biotina anti-IL-6 humana (R&D Systems, DY206, Cat. Nº 840114), anti-IL-36ra humana (R&D Systems, Cat. Nº AF1275). El ELISA se llevó a cabo esencialmente como se ha descrito anteriormente. No se pudieron detectar reactividades cruzadas de DLX2323 para ninguno de estos miembros de la familia de IL-1 humana probados ni citocinas.

Ejemplo 8 - Eficacia *in vivo*

En este ejemplo, se demuestra la inhibición *in vivo* de la actividad de IL-1 beta humana por DLX2323. La IL-1 beta humana puede unir y activar el receptor de IL-1 de ratón, induciendo así una respuesta inflamatoria en el ratón *in vivo*. La inflamación conduce a niveles elevados de citocinas en el suero que incluye IL-6 de ratón (mIL-6). Se administró IL-1 beta humana recombinante (Peprotech, Cat. Nº 200-01B) por vía subcutánea a una dosis de 1,5 mcg/kg de peso corporal a ratones BALB/c de 8 semanas de edad (Charles River, Alemania). Después de 2 horas los niveles de mIL-6 fueron significativamente elevados en suero. Para probar la capacidad de neutralización de DLX2323 *in vivo*, se inyectó por vía intraperitoneal (i.p.) dos horas antes de la dosis de IL-1 beta. Un grupo de ratones se inyectó con una dosis de 5 mg/kg de DLX2323, el grupo segundo se inyectó con una dosis de 15 mg/kg de DLX2323. Se trataron grupos de control negativo con o PBS i.p. o scFvs de especificidad irrelevante. Un quinto

grupo de ratones se inyectó por vía intravenosa con 10 mg/kg de canakinumab (Novartis, Ilaris®) como control positivo. Dos horas después de la aplicación de rhIL-1 beta, se tomaron muestras de sangre y se midieron los niveles en suero de mIL-6 usando el kit de ELISA mouse IL-6 DuoSet según las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Cat. Nº DY406). Para los grupos de ratones tratados con DLX2323 y canakinumab, solo se pudieron detectar cantidades muy bajas de mIL-6 o incluso sin mIL-6 (0,0-2 pg/mL de mIL-6; Figura 4). Los ratones que recibieron PBS o scFv de control mostraron niveles de IL-6 significativamente elevados de 50 a 170 pg/mL. DLX2323 fue muy eficiente en neutralizar IL-1 beta humana en un contexto *in vivo*, incluso a una dosis de 5 mg/kg.

Aunque se muestran y describen realizaciones actualmente preferidas de la invención, se debe entender que la invención no se limita a éstas, sino que se puede interpretar y poner en práctica diversamente de otro modo dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Delenex Therapeutics AG

<120> Miembros de unión a IL-1 beta

<130> P109026PC00

<150> US 61/722532

<151> 05-11-2012

<150> EP 12007503.1

<151> 05-11-2012

<160> 163

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 1

Phe Ser Leu Ser Ser Ala Ala Met Ala
1 5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

ES 2 795 829 T3

<400> 2

Ile Ile Tyr Asp Ser Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

5 <210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

10 <400> 3

Glu Arg Ala Ile Phe Ser Gly Asp Phe Val Leu
1 5 10

<210> 4

15 <211> 11

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 4

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asp Asn Trp Leu Ser
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

25 <213> Oryctolagus cuniculus

<400> 5

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

30 <210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 6

35

ES 2 795 829 T3

Gln Asn Thr Gly Gly Gly Val Ser Ile Ala
1 5 10

<210> 7

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia humanizada de VH

10

<400> 7

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

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

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

Gly Ile Ile Tyr Asp Ser Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Glu Arg Ala Ile Phe Ser Gly Asp Phe Val Leu Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

15 <210> 8

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> secuencia humanizada de VL

<400> 8

```

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65             70             75             80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Thr Gly Gly Gly Val Ser
          85             90             95

Ile Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
          100             105

```

5 <210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> secuencia conectora

<400> 9

```

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1             5             10             15

Gly Gly Gly Ser
          20

```

15 <210> 10
<211> 248
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> scFv humanizada de IL-1 beta

<400> 10

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asp Asn Trp
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Thr Gly Gly Gly Val Ser
 85 90 95
 Ile Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly
 100 105 110
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 130 135 140
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser
 145 150 155 160
 Ala Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 165 170 175
 Val Gly Ile Ile Tyr Asp Ser Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
 180 185 190
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 195 200 205
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 210 215 220
 Ala Arg Glu Arg Ala Ile Phe Ser Gly Asp Phe Val Leu Trp Gly Gln
 225 230 235 240
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245

5

<210> 17

ES 2 795 829 T3

<211> 744

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> secuencia de ADN de DLX2323

<400> 17

```

gaaattgtta tgaccagag cccgagcacc ctgagcgcaa gcgttggtga tcgtgtgatt      60
attacctgtc aggcaagcca gagcattgat aattggctga gctgggtatca gcagaaaccg      120
ggtaaagcac cgaaactgct gatttatcgt gcaagcacc tggcaagcgg tgttccgagc      180
cgtttttagcg gtagcggtag tgggtgcagaa ttaccctga ccattagcag cctgcagccg      240
gatgatattt caacctatta ttgtcagaat accggtggtg gtgtagcat tgcatttggt      300
cagggcacca aactgaccgt tctgggtggt ggcggtggat ccggtggggg tggtagcgga      360
ggtggtggtt cagggcgttg tggcagcgaa gttcagctgg ttgaaagtgg tgggtgtctg      420
gttcagcctg gtggtagcct gcgtctgagc tgtaccgcaa gcggttttag cctgagcagc      480
gcagcaatgg catgggttcg tcaggcacct ggtaaaggct tggaaatggg tggattatc      540
tatgatagcg caagcaccta ttatgcaagc tgggcaaaag gtcgttttac cattagccgt      600
gataccagta aaaataccgt ttacctgcag atgaatagtc tgcgtgcaga ggataccgca      660
gtgtattatt gtgcacgtga acgtgcaatt ttcagcgggtg attttgttct gtggggtcag      720
ggaaccctgg ttaccgttag cagc                                         744

```

10

<210> 18

<211> 23

<212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de la región estructural L1

20

<400> 18

```

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys
                20

```

<210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> secuencia de la región estructural L2

 10 <400> 19

 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

 <210> 20
 15 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> secuencia de la región estructural L3

 <400> 20

 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr
 1 5 10 15

 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 25

 <210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30

 <220>
 <223> secuencia de la región estructural L4

 <400> 21

ES 2 795 829 T3

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
1 5 10

<210> 22

5 <211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia de la región estructural H1

<400> 22

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly
20 25

15

<210> 23

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> secuencia de la región estructural H2

<400> 23

25

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
1 5 10

<210> 24

<211> 32

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 795 829 T3

<223> secuencia de la región estructural H3

<400> 24

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

5 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de la región estructural H4

15 <400> 25

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 26

20 <211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> secuencia de la región estructural H1

<400> 26

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly
20 25

30

<210> 27

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia de la región estructural H2

<400> 27

10

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Gly
1				5					10				

<210> 28
 <211> 32
 <212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de la región estructural H3

20

<400> 28

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	

Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

<210> 29
 <211> 11
 <212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de la región estructural H4

30

<400> 29

ES 2 795 829 T3

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 30

<211> 26

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de la región estructural H1

10

<400> 30

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly
20 25

15 <210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> secuencia de la región estructural H2

<400> 31

25 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
1 5 10

<210> 32

<211> 32

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de la región estructural H3

<400> 32

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ser Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

5

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> secuencia de la región estructural H4

<400> 33

15

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo contra IL-1 beta, que comprende
 - las secuencias de CDR de la cadena pesada variable (VH) CDR-H1, CDR-H2 o CDR-H3 como se exponen en SEQ ID NOs: 1, 2 y 3, respectivamente; y
- 5 las secuencias de CDR de la cadena ligera variable (VL) CDR-L1, CDR-L2 o CDR-L3 como se exponen en SEQ ID NOs: 4, 5 y 6, respectivamente.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, que es un fragmento de anticuerpo monovalente, preferentemente un fragmento Fab, Fab', scFv o Fv.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, que es una inmunoglobulina de longitud completa o un fragmento de anticuerpo bivalente, preferentemente F(ab')₂.
- 10 4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende
 - a. una secuencia de VH que comprende SEQ ID NO: 7; y/o
 - b. una secuencia de VL que comprende SEQ ID NO: 8.
5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende la secuencia conectora de SEQ ID NO: 9.
- 15 6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO: 10.
7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que reacciona de forma cruzada con IL-1 beta de cinomolgo, IL-1 beta de mono rhesus y/o IL-1 beta de rata.
- 20 8. Un miembro de unión que comprende las secuencias de la cadena ligera y pesada variable del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o el miembro de unión de la reivindicación 8, que está química o biológicamente modificado.
10. Una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o el miembro de unión de la reivindicación 8, comprendiendo dicha secuencia de ácidos nucleicos preferentemente SEQ ID NO: 17.
- 25 11. Un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la reivindicación 10.
12. Una célula hospedadora que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la reivindicación 10 o el vector de la reivindicación 11.
- 30 13. Una composición cosmética, de diagnóstico o farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, el miembro de unión de la reivindicación 8, la secuencia de ácidos nucleicos de la reivindicación 10, el vector de la reivindicación 11 o la célula hospedadora de la reivindicación 12; y además un vehículo, diluyente o excipiente adecuado.
- 35 14. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, el miembro de unión de la reivindicación 8, la secuencia de ácidos nucleicos de la reivindicación 10, el vector de la reivindicación 11 o la célula hospedadora de la reivindicación 12
 - (i) para su uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por IL-1 beta, seleccionada de retinopatía diabética proliferativa, artritis gotosa, síndrome de Schnitzler, artritis juvenil idiopática sistémica, artritis reumatoide, artritis gotosa aguda, artritis gotosa crónica, urticaria, vasculitis, diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, espondilitis anquilosante, osteomielitis multifocal recurrente, policondritis recidivante, síndrome periódico asociado a la ciropinina (CAPS), enfermedad de Behçet, fiebre mediterránea familiar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, polimialgia reumática, mutaciones NALP3, pioderma gangrenoso, urticaria idiopática crónica, osteoartritis, degeneración macular senil húmeda, síndrome del ojo seco, psoriasis pustular, síndrome de sinovitis-acné-pustulosis-hiperostosis-osteítis, síndrome de activación de macrófagos, síndrome de fiebre periódica-adenitis-faringitis-úlceras aftosas, enfermedad de Still del adulto, deficiencia de mevalonato cinasa, aterosclerosis, síndrome periódico asociado al receptor de TNF (TRAPS), acné vulgar y/o acné inversa;
 - (ii) para su uso en diagnósticos y/o;
 - (iii) para fines de detección.
- 40
- 45

15. Un método de producción del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o el miembro de unión de la reivindicación 8, que comprende las etapas de o

(A)

- 5 (i) cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 12 de manera que se exprese el anticuerpo o el miembro de unión;
- (ii) recuperar; y
- (iii) purificar el anticuerpo o el miembro de unión, respectivamente; o

(B)

- 10 (i) proporcionar un sistema sin células,
- (ii) proporcionar un molde de producto de ácido nucleico,
- (iii) permitir la transcripción y traducción de dicho molde de producto de ácido nucleico;
- (iv) recuperar; y
- (v) opcionalmente purificar el anticuerpo o el miembro de unión, respectivamente.

15 16. Un kit que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o el miembro de unión de la reivindicación 8 junto con una combinación envasada de reactivos e instrucciones para su uso.

17. Uso cosmético del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, el miembro de unión de la reivindicación 8, la secuencia de ácidos nucleicos de la reivindicación 10, el vector de la reivindicación 11 o la célula hospedadora de la reivindicación 12.

Figura 1

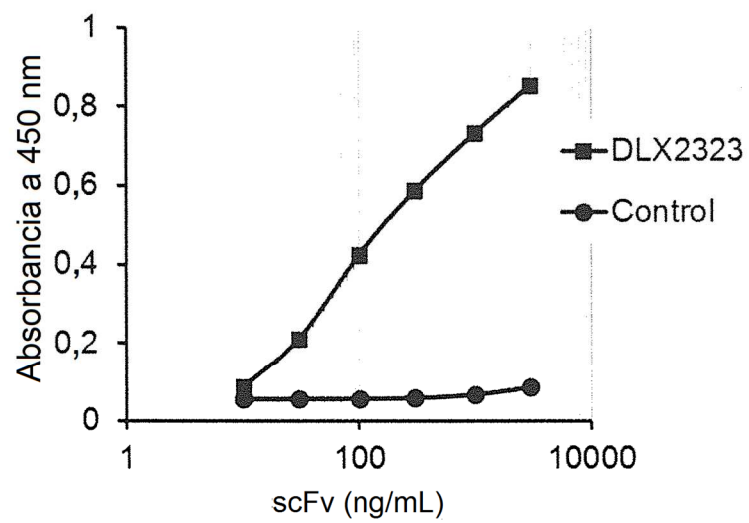


Figura 2

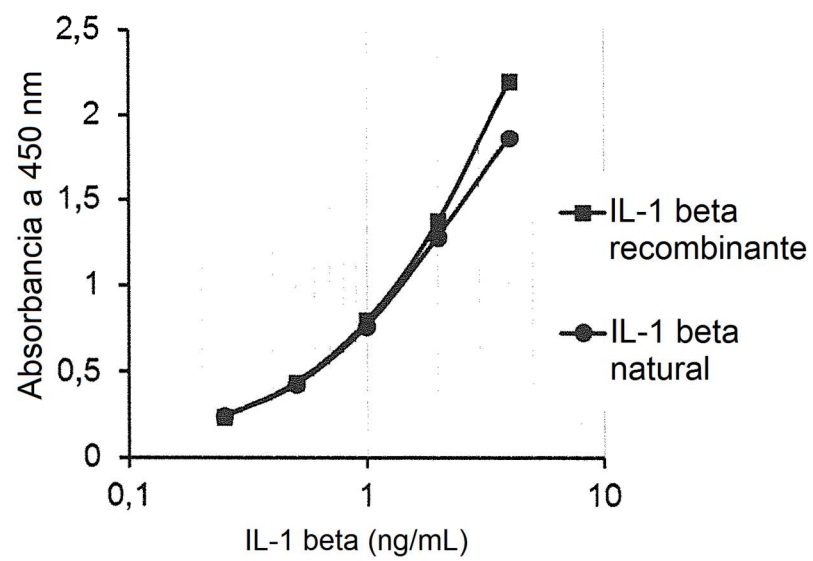
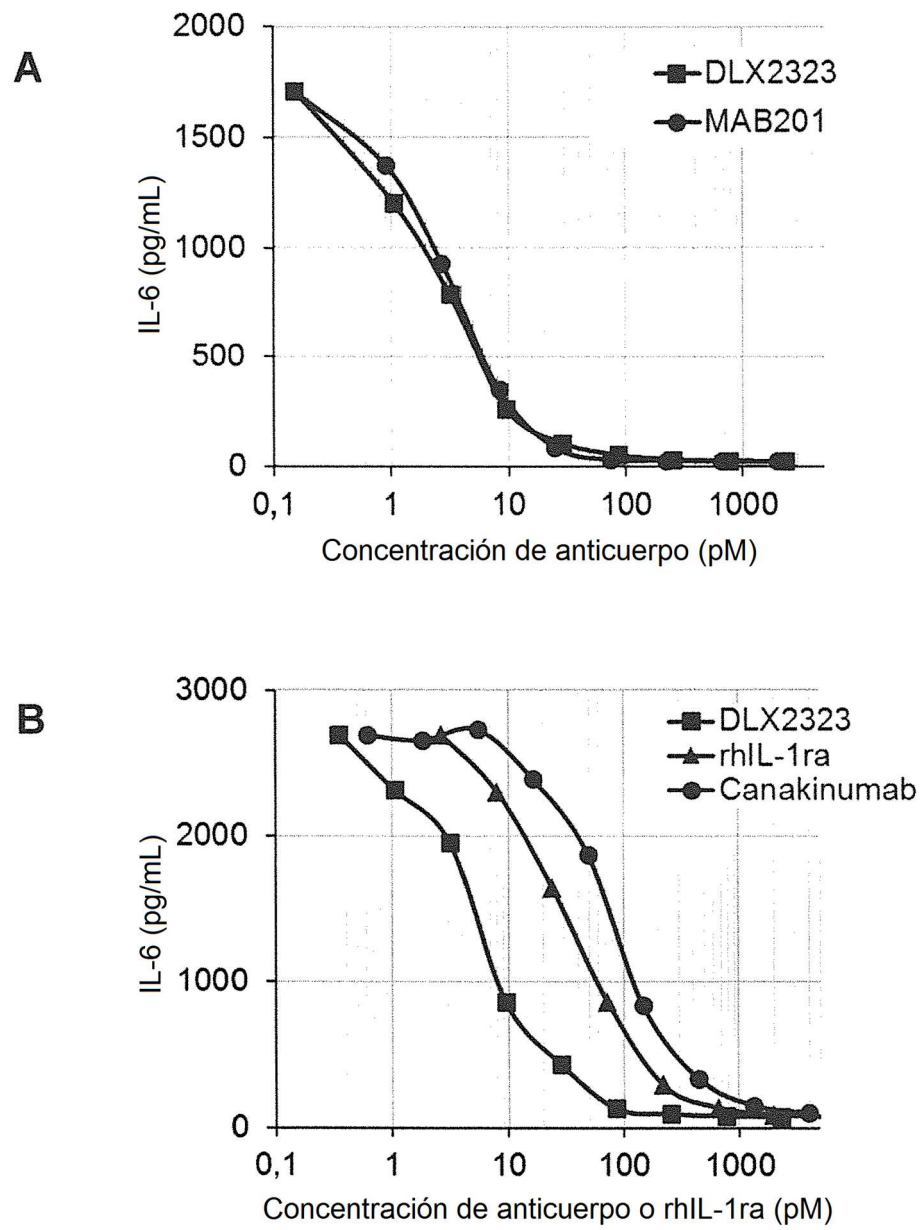


Figura 3



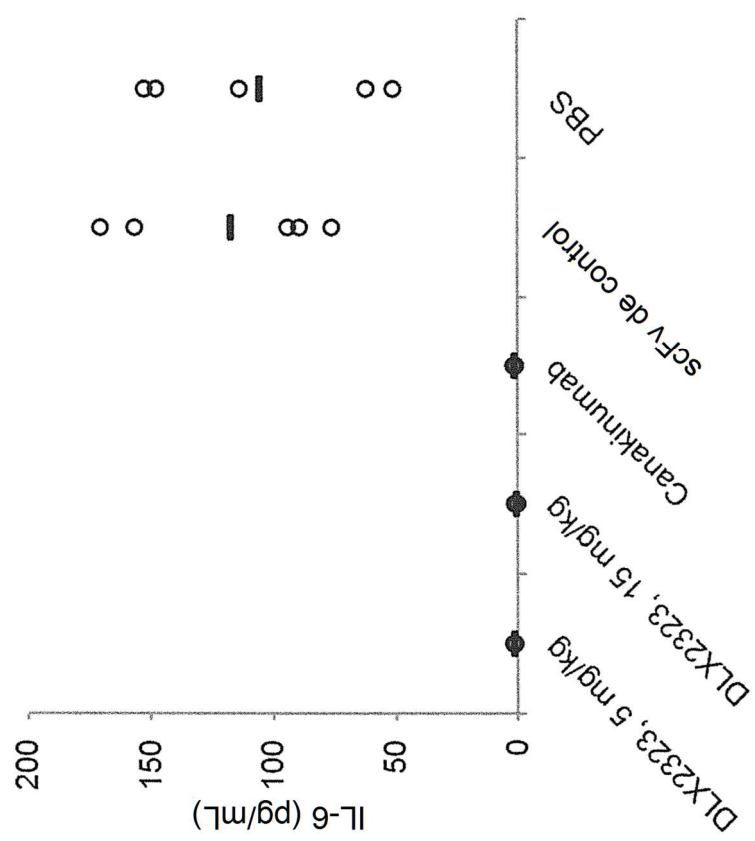


Figura 4

Figura 5

