

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 110**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.02.2013 PCT/SG2013/000057**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013 WO13122544**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2013 E 13748708 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 2814843**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales humanos neutralizantes de IL- β**

30 Prioridad:

13.02.2012 SG 201201007

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

09.12.2020

73 Titular/es:

**AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH (100.0%)
1 Fusionopolis Way 20-10 Connexis
Singapore 138632, SG**

72 Inventor/es:

**WANG, CHENG-I;
GOH, ANGELINE;
YEO, SIOK PING;
MORTELLARO, ALESSANDRA;
BISWAS, SUBHRA KUMAR;
GINHOUX, FLORENT y
ZHONG, PINGYU**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 798 110 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales humanos neutralizantes de IL- β

5 Campo técnico

Se proporcionan proteínas de unión a antígeno y en particular proteínas de unión a antígeno de IL-1 β . Más específicamente, la presente invención se refiere a secuencias de las proteínas de unión y las cadenas pesadas y ligeras. También se proporcionan composiciones que comprenden las proteínas de unión a antígeno, el uso de las proteínas de unión a antígeno y métodos para la producción.

Antecedentes

La interleucina-1 beta (IL-1 β) es un miembro de la familia de las citocinas Interleucina-1 y es un mediador importante de la respuesta inflamatoria. Es una citocina proinflamatoria y participa en la proliferación, diferenciación y apoptosis de células.

La sobreexpresión de IL-1 β se ha implicado en una serie de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias tales como síndromes periódicos asociados a la criopirina y trastornos relacionados, diabetes, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, carcinoma de células renales, gota y acné inflamatorio. Geiger et al. (*Clin Exp Rheumatol.* 11(5): 515-522, 1993) demuestra en un modelo murino para la artritis que el anticuerpo anti-IL-1 β podría prevenir la destrucción de las articulaciones. El documento WO 2007/002261 desvela anticuerpos anti-IL-1 β y el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, cánceres, etc. usando dichos anticuerpos. El documento WO02/16436 desvela ACZ885 (ahora denominado canakinumab), que se convirtió en el anticuerpo de referencia para su uso en la terapia de bloqueo de IL-1b, principalmente en la inflamación.

Es un objetivo de la presente divulgación proporcionar proteínas de unión a antígeno específicas para IL-1 β que puedan neutralizar la actividad de IL-1 β para prevenir o tratar enfermedades asociadas a una producción aumentada de IL-1 β .

Hasta ahora, se han aprobado tres productos biológicos que se dirigen a la vía de señalización de IL-1 β para su uso clínico: *anakinra* (*antagonista del receptor de anIL-1*), *rilonacept* (una proteína de fusión que comprende el receptor 1 de IL-1) y *canakinumab* (*un anticuerpo monoclonal*).

Además de los tres bloqueantes de IL-1 aprobados mencionados anteriormente, el anticuerpo monoclonal humanizado XOMA-052 (gevokizumab) se encuentra actualmente en desarrollo clínico. Cada molécula presenta mecanismos únicos de acción y muestra diferente reactividad cruzada y perfil farmacológico.

Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas y cualesquier otros aspectos o realizaciones que se exponen en el presente documento son solamente informativos. Específicamente, la invención se refiere a una proteína de unión a antígeno específica de IL-1 β aislada, sus secuencias codificantes, vectores, células hospedadoras y método de producción como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Definiciones

Las siguientes palabras y términos utilizados en el presente documento tendrán el significado indicado:

La expresión "proteína de unión a antígeno" como se usa en el presente documento se refiere a anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y otras construcciones proteínicas, tales como dominios, que son capaces de unirse a IL-1 β

El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento en el sentido más amplio para referirse a moléculas con un dominio similar a inmunoglobulina incluye anticuerpos monoclonales, recombinantes, policlonales, quiméricos, humanizados, biespecíficos, multiespecíficos y heteroconjugados; un dominio variable único, un anticuerpo de dominio, fragmentos de unión a antígeno, fragmentos inmunológicamente eficaces, Fv monocatenario, diacuerpos, Tandabs™, etc. (para un sumario de formatos alternativos de "anticuerpo", véase Holliger y Hudson, *Nature Biotechnology*, 2005, Vol. 23, N.º 9, 1126-1136).

La frase "dominio variable único" se refiere a un dominio variable de proteína de unión a antígeno (por ejemplo, V_H, V_{HH}, V_L) que se une específicamente a un antígeno o epítipo independientemente de una región o dominio variable diferente.

Un "anticuerpo de dominio" o "dAb" puede considerarse lo mismo que un "dominio variable único" que es capaz de unirse a un antígeno. Un dominio variable único puede ser un dominio variable de anticuerpo humano, pero también incluye dominios variables de anticuerpo únicos de otras especies tales como roedores (por ejemplo, como se desvela

en el documento WO 00/29004), dAbs V_{HH} de tiburón nodriza y camélidos. Los V_{HH} de camélidos son polipéptidos de dominio variable único de inmunoglobulina que derivan de especies que incluyen camello, llama, alpaca, dromedario y guanaco, que producen anticuerpos de cadena pesada desprovistos de forma natural de cadenas ligeras. Dichos dominios V_{HH} pueden humanizarse de acuerdo con técnicas convencionales disponibles en la técnica y dichos dominios se consideran "anticuerpos de dominio". Como se usa en el presente documento, V_H incluye dominios V_{HH} de camélidos.

Como se usa en el presente documento, el término "dominio" se refiere a una estructura de proteína plegada que tiene una estructura terciaria independiente del resto de la proteína. En general, los dominios son responsables de las propiedades funcionales individuales de las proteínas y, en muchos casos, pueden añadirse, retirarse o transferirse a otras proteínas sin pérdida de función del resto de la proteína y/o del dominio. Un "dominio variable único" es un dominio de polipéptido plegado que comprende secuencias características de dominios variables de anticuerpo. Por tanto, incluye dominios variables de anticuerpo completos y dominios variables modificados, por ejemplo, en los que uno o más bucles han sido reemplazados por secuencias que no son características de los dominios variables de anticuerpo, o dominios variables de anticuerpo que se han truncado o comprenden extensiones N o C terminales, así como fragmentos plegados de dominios variables que conservan al menos la actividad de unión y la especificidad del dominio de longitud completa. Un dominio puede unirse a un antígeno o epítipo independientemente de una región o dominio variable diferente.

Puede proporcionarse un fragmento de unión a antígeno por medio de la disposición de una o más CDR en armazones de proteínas no de anticuerpo, tales como un dominio. El dominio puede ser un anticuerpo de dominio o puede ser un dominio que sea un derivado de un armazón seleccionado entre el grupo que consiste en CTLA-4 (Evibody); lipocalina; moléculas derivadas de la Proteína A tales como el dominio Z de la Proteína A (Affibody, SpA), dominio A (Avimer/Maxibody); proteínas de choque térmico tales como GroEl y GroES; transferrina (trans-cuerpo); proteína de repetición de anquirina (DARPin); aptámero peptídico; dominio de lectina de tipo C (Tetranectina); γ -cristalina humana y ubiquitina humana (afilinas); dominios PDZ; dominios de tipo toxinkunitz de escorpión de inhibidores de proteasa humana; y fibronectina (adnectina); que se ha sometido a ingeniería de proteínas con el fin de obtener la unión a un ligando que no sea su ligando natural.

CTLA-4 (antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos) es un receptor de la familia de CD28 expresado principalmente en linfocitos T CD4+. Su dominio extracelular tiene un plegamiento de Ig similar a un dominio variable. Los bucles que corresponden a las CDR de anticuerpos pueden sustituirse por secuencias heterólogas para conferir diferentes propiedades de unión. Las moléculas CTLA-4 diseñadas para tener diferentes especificidades de unión también se conocen como Evibodies. Para más detalles, véase *Journal of Immunological Methods* 248 (1-2), 31-45 (2001).

Las lipocalinas son una familia de proteínas extracelulares que transportan moléculas hidrófobas pequeñas, tales como esteroides, bilinas, retinoides y lípidos. Tienen una estructura de lámina β rígida con una serie de bucles en el extremo abierto de la estructura cónica que puede diseñarse para unirse a diferentes antígenos diana. Las anticalinas tienen un tamaño de entre 160-180 aminoácidos y derivan de las lipocalinas. Para detalles adicionales, véase *Biochim Biophys Acta* 1482: 337-350 (2000), documento US7250297B1 y documento US20070224633

Un affibody es un armazón derivado de proteína A de *Staphylococcus aureus* que puede diseñarse para unirse a un antígeno. El dominio consiste en un haz de tres hélices de aproximadamente 58 aminoácidos. Se han generado bibliotecas mediante aleatorización de restos superficiales. Para detalles adicionales, véase *Protein Eng. Des. Sel.* 17, 455-462 (2004) y el documento EP1641818A1.

Los avímeros son proteínas multidominio derivadas de la familia de armazón de dominio A. Los dominios nativos de aproximadamente 35 aminoácidos adoptan una estructura unida por disulfuro definida. Se genera diversidad mediante reordenamiento de la variación natural que presenta la familia de dominios A. Para detalles adicionales véase *Nature Biotechnology* 23(12), 1556 - 1561 (2005) y *Expert Opinion on Investigational Drugs* 16(6), 909-917 (junio de 2007)

Una transferrina es una glucoproteína monomérica de transporte en suero. Las transferrinas pueden diseñarse para unirse a diferentes antígenos diana mediante inserción de secuencias peptídicas en un bucle superficial permisivo. Los ejemplos de estructuras de transferrina diseñadas incluyen el Trans-body. Para detalles adicionales, véase *J. Biol. Chem* 274, 24066-24073 (1999).

Las proteínas de repetición de anquirina diseñadas (DARPin) derivan de la anquirina, que es una familia de proteínas que median la unión de proteínas integrales de membrana al citoesqueleto. Una repetición de anquirina única es un motivo de 33 restos que consiste en dos hélices α y una vuelta β . Pueden diseñarse para unirse a diferentes antígenos diana aleatorizando restos la primera hélice α y una vuelta β de cada repetición. Su interfaz de unión puede aumentarse aumentando el número de módulos (un método de maduración de afinidad). Para detalles adicionales, véase *J. Mol. Biol.* 332, 489-503 (2003), *PNAS* 100(4), 1700-1705 (2003) y *J. Mol. Biol.* 369, 1015-1028 (2007) y el documento US20040132028A1.

La fibronectina es un armazón que puede diseñarse para unirse a un antígeno. Las adnectinas consisten en una estructura de la secuencia natural de aminoácidos del 10º dominio de las 15 unidades de repetición de fibronectina

humana de tipo III (FN3). Pueden diseñarse tres bucles en un extremo del sándwich β para permitir que una adnectina reconozca específicamente una diana terapéutica de interés. Para detalles adicionales, véase *Protein Eng. Des. Sel.* 18, 435-444 (2005), documento US20080139791, documento W02005056764 y documento US6818418B1.

5 Los aptámeros peptídicos son moléculas de reconocimiento combinatorias que consisten en una proteína de armazón constante, normalmente tiorredoxina (TrxA) que contiene un bucle peptídico variable comprimido insertado en el sitio activo. Para detalles adicionales, véase *Expert Opin. Biol. Ther.* 5, 783-797 (2005).

10 Los microbodies derivan de microproteínas de origen natural de 25-50 aminoácidos de longitud que contienen 3-4 puentes de cisteína; los ejemplos de microproteínas incluyen KalataBI y conotoxina y knotinas. Las microproteínas tienen un bucle que puede diseñarse para incluir hasta 25 aminoácidos sin afectar al plegamiento global de la microproteína. Para detalles adicionales de dominios de knotina diseñados, véase el documento W02008098796.

15 Otros dominios de unión incluyen proteínas que se han utilizado como armazón para diseñar diferentes propiedades de unión a antígeno diana que incluyen γ -cristalina humana y ubiquitina humana (afilinas), dominios de tipo kunitz de inhibidores de proteasa humana, dominios PDZ de la proteína de unión a Ras AF-6, toxinas de escorpión (caribdotoxina), dominio de lectina de tipo C (tetranectinas) que se revisan en el Capítulo 7 - *Non-Antibody Scaffolds* del *Handbook of Therapeutic Antibodies* (2007, editado por Stefan Dubel) y *Protein Science* 15: 14-27 (2006). Los dominios de unión de la presente divulgación podrían derivar de cualquiera de estos dominios proteínicos alternativos.

20 Un fragmento de unión a antígeno o un fragmento inmunológicamente eficaz puede comprender secuencias variables de cadenas pesadas o ligeras parciales. Los fragmentos tienen al menos 5, 6, 8 o 10 aminoácidos de longitud. Como alternativa, los fragmentos tienen al menos 15, al menos 20, al menos 50, al menos 75 o al menos 100 aminoácidos de longitud.

25 El término "neutraliza" como se usa en toda la presente memoria descriptiva significa que la actividad biológica de IL-1 β se reduce en presencia de una proteína de unión a antígeno como se describe en el presente documento en comparación con la actividad de IL-1 β en ausencia de la proteína de unión a antígeno, *in vitro* o *in vivo*. La neutralización puede deberse a uno o más de entre el bloqueo de la unión de IL-1 β a su receptor, la evitación de que IL-1 β active su receptor, la regulación negativa de IL-1 β o su receptor o la afectación de la funcionalidad efectora.

30 La reducción o inhibición de la actividad biológica puede ser parcial o total. Una proteína de unión a antígeno neutralizante puede neutralizar la actividad de IL-1 β en al menos un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 82 %, 84 %, 86 %, 88 %, 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % con respecto a la actividad de IL-1 β en ausencia de la proteína de unión a antígeno.

35 La neutralización puede determinarse o medirse usando uno o más ensayos conocidos por el experto o que se describen en el presente documento. Por ejemplo, la unión de la proteína de unión a antígeno a IL-1 β puede evaluarse en un ELISA sandwich, mediante BIAcore™, FMAT, FORTEbio o ensayos *in vitro* similares, pero también en ensayos funcionales basados en células.

40 Las "CDR" se definen como las secuencias de aminoácidos de la región determinante de complementariedad de una proteína de unión a antígeno. Estas son las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina. Hay tres CDR (o regiones CDR) de cadena pesada y tres CDR (o regiones CDR) de cadena ligera en la porción variable de una inmunoglobulina. Por tanto, "CDR", como se usa en el presente documento, se refiere a las tres CDR de cadena pesada, las tres CDR de cadena ligera, todas las CDR de cadena pesada y ligera, o al menos dos CDR.

45 En toda la presente memoria descriptiva, los restos de aminoácidos en secuencias de dominio variable y secuencias de anticuerpo de longitud completa se numeran de acuerdo con la convención de numeración de Kabat. De forma similar, los términos "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2", "CDRH3" utilizados en los Ejemplos siguen la convención de numeración de Kabat. Para información adicional, véase Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4ª Ed., Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, Institutos Nacionales de Salud (1987).

50 Será evidente para los expertos en la materia que existen convenciones de numeración alternativas para restos de aminoácidos en secuencias de dominio variable y secuencias de anticuerpo de longitud completa. También existen convenciones de numeración alternativas para secuencias de CDR, por ejemplo, las que se exponen en Chothia et al. (1989) *Nature* 342: 877-883. La estructura y el plegamiento de proteína del anticuerpo pueden significar que otros restos se consideran parte de la secuencia de CDR y así lo comprendería un experto.

55 Otras convenciones de numeración para secuencias de CDR disponibles para un experto incluyen los métodos "AbM" (University of Bath) y "contacto" (University College London). La región de solapamiento mínima que usa al menos dos de los métodos Kabat, Chothia, AbM y contacto puede determinarse para proporcionar la "unidad de unión mínima". La unidad de unión mínima puede ser una sub-porción de una CDR.

La tabla a continuación representa una definición usando cada convención de numeración para cada CDR o unidad de unión. El esquema de numeración de Kabat se usa en la Tabla 1 para numerar la secuencia de aminoácidos del dominio variable. Cabe señalar que algunas de las definiciones de CDR pueden variar dependiendo de la publicación individual utilizada.

5

	CDR Kabat	CDR Chothia	CDR AbM	CDR contacto	Unidad de unión mínima
H1	31-35/35A/35B	26-32/33/34	26-35/35A/35B	30-35/35A/35B	31-32
H2	50-65	52-56	50-58	47-58	52-56
H3	95-102	95-102	95-102	93-101	95-101
L1	24-34	24-34	24-34	30-36	30-34
L2	50-56	50-56	50-56	46-55	50-55
L3	89-97	89-97	89-97	89-96	89-96

Para las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, la expresión "idéntica" o "identidad de secuencia" indica el grado de identidad entre dos secuencias de ácido nucleico o dos secuencias de aminoácidos cuando se alinean de forma óptima y se comparan con inserciones o supresiones adecuadas.

10

El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones multiplicado por 100), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden conseguirse usando un algoritmo matemático, como se describe a continuación.

15

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el programa GAP en el paquete de software GCG, usando una matriz NWSgapdna.CMP y una ponderación de hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y una ponderación de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos también puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4: 11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de restos ponderados PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48: 444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG, usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250 y una ponderación por hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y una ponderación por longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

20

25

A modo de ejemplo, una secuencia polinucleotídica puede ser idéntica a una secuencia polinucleotídica de referencia como se describe en el presente documento (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: X), que es idéntica al 100 % o puede incluir hasta un determinado número entero de alteraciones de nucleótidos en comparación con la secuencia de referencia, tal como al menos un 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % idéntica. Dichas alteraciones se seleccionan entre al menos una supresión, sustitución, de nucleótidos, incluyendo transición y transversión o inserción, y en donde dichas alteraciones pueden producirse en las posiciones terminales 5' o 3' de la secuencia nucleotídica de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas ya sea individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. El número de alteraciones de nucleótidos se determina multiplicando el número total de nucleótidos en una secuencia polinucleotídica de referencia, por el porcentaje numérico del porcentaje de identidad respectivo (dividido por 100) y restando ese producto de dicho número total de nucleótidos en la secuencia polinucleotídica de referencia como se indica a continuación:

30

35

40

$$n_n \leq x_n - (x_n \cdot y),$$

en donde n_n es el número de alteraciones de nucleótidos, x_n es el número total de nucleótidos en la secuencia polinucleotídica de referencia e y es 0,50 para el 50 %, 0,60 para el 60 %, 0,70 para el 70 %, 0,75 para el 75 %, 0,80 para el 80 %, 0,85 para el 85 %, 0,90 para el 90 %, 0,95 para el 95 %, 0,98 para el 98 %, 0,99 para el 99 % o 1,00 para el 100 %, \cdot es el símbolo para el operador de multiplicación, y en donde cualquier producto no entero de x_n e y se redondea hacia abajo al número entero más cercano antes de restarlo de x_n .

45

De forma similar, una secuencia polipeptídica puede ser idéntica a una secuencia polipeptídica de referencia, que es un 100 % idéntica, o puede incluir hasta un determinado número entero de alteraciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de referencia de manera que el % de identidad sea inferior al 100 %, tal como al menos un 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % idéntica. Dichas alteraciones se seleccionan entre el grupo que consiste en al menos una supresión, sustitución, de aminoácidos, incluyendo una sustitución conservadora o no conservadora,

50

o inserción, y en donde dichas alteraciones pueden producirse en las posiciones amino o carboxi terminales de la secuencia polipeptídica de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas ya sea individualmente entre los aminoácidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. El número de alteraciones de aminoácidos para un % de identidad determinado se determina multiplicando el número total de aminoácidos en la secuencia polipeptídica codificada por la secuencia polipeptídica de referencia por el porcentaje numérico del porcentaje de identidad respectivo (dividido por 100) y después restando ese producto de dicho número total de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia como se indica a continuación:

$$n_a < x_a - (x_a \cdot y),$$

en donde n_a es el número de alteraciones de aminoácidos, x_a es el número total de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia e y es, 0,50 para el 50 %, 0,60 para el 60 %, 0,70 para el 70 %, 0,75 para el 75 %, 0,80 para el 80 %, 0,85 para el 85 %, 0,90 para el 90 %, 0,95 para el 95 %, 0,98 para el 98 %, 0,99 para el 99 % o 1,00 para el 100 %, \cdot es el símbolo para el operador de multiplicación, y en donde cualquier producto no entero de x_a e y se redondea hacia abajo al número entero más cercano antes de restarlo de x_a . El % de identidad puede determinarse a lo largo de longitud de la secuencia.

La expresión "se une específicamente" como se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva con respecto a proteínas de unión a antígeno significa que la proteína de unión a antígeno se une a un epítipo diana en IL-1 β con una afinidad superior a la que se obtiene cuando se une a un epítipo no diana. En determinadas realizaciones, la unión específica se refiere a la unión a una diana con una afinidad que es al menos 10, 50, 100, 250, 500 o 1000 veces superior a la afinidad por un epítipo no diana. Por ejemplo, la afinidad de unión puede medirse mediante métodos habituales, por ejemplo, mediante ELISA competitivo o mediante la medición de K_d con BIACORE™, KINEXA™ o PROTEON™.

El término "CI₅₀", como se usa en el presente documento, significa la concentración molar de una sustancia (antagonista) que reduce la eficacia de un agonista de referencia o la actividad constitutiva de una diana biológica en un 50 % de una curva antagonista (Parte superior-Parte inferior) para una sustancia de ensayo particular.

El término "CE₅₀", como se usa en el presente documento, significa la concentración molar de una sustancia (agonista) que induce una respuesta del 50 % del efecto máximo de una curva de dosis-respuesta.

En toda la presente memoria descriptiva, los restos de aminoácidos en secuencias de dominio variable y secuencias de anticuerpo de longitud completa se numeran de acuerdo con la convención de numeración de Kabat. Para información adicional, véase Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4ª Ed., Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, Institutos Nacionales de Salud (1987).

Será evidente para los expertos en la materia que existen convenciones de numeración alternativas para restos de aminoácidos en secuencias de dominio variable y secuencias de anticuerpo de longitud completa. También existen convenciones de numeración alternativas para secuencias de CDR, por ejemplo, las que se exponen en Chothia et al. (1989) *Nature* 342: 877-883. La estructura y el plegamiento de proteína del anticuerpo pueden significar que otros restos se consideran parte de la secuencia de CDR y así lo comprendería un experto.

Otras convenciones de numeración para secuencias de CDR disponibles para un experto incluyen los métodos "AbM" (University of Bath) y "contacto" (University College London). La región de solapamiento mínima que usa al menos dos de los métodos Kabat, Chothia, AbM y contacto puede determinarse para proporcionar la "unidad de unión mínima". La unidad de unión mínima puede ser una sub-porción de una CDR.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" tiene por objeto incluir disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares. Se conoce bien en la técnica el uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con compuesto, se contempla el uso del mismo en las composiciones terapéuticas y los métodos de tratamiento y profilaxis. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las presentes composiciones. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis.

El ácido nucleico, como se usa en el presente documento, significa cualquier molécula de ARN o ADN monocatenaria o bicatenaria, tal como ARNm, ADNc y ADN genómico.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente", en el contexto de concentraciones de componentes de las formulaciones, normalmente significa +/- el 5 % del valor establecido, más normalmente +/- el 4 % del valor establecido, más normalmente +/- el 3 % del valor establecido, más normalmente +/- el 2 % del valor establecido, aún más normalmente +/- el 1 % del valor establecido e incluso más normalmente +/- el 0,5 % del valor establecido.

A lo largo de la presente divulgación, determinadas realizaciones pueden desvelarse en un formato de intervalo. Ha de comprenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de los intervalos desvelados. En consecuencia, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha desvelado específicamente todos los subintervalos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 ha desvelado específicamente subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

Perspectivas de desarrollo adicional

Además de la invención, se proporcionan los siguientes aspectos con el fin de facilitar desarrollos adicionales de proteínas de unión a antígeno específicas para IL-1b. Estos aspectos se excluyen explícitamente del alcance de la invención.

El primero de dichos aspectos prevé una proteína de unión a antígeno específica de IL-1 β aislada que comprende una o más unidades de unión seleccionadas entre el grupo que consiste en las siguientes unidades de unión:

- (i) una unidad de unión L1 que comprende los restos Kabat 23-35 de la SEQ ID NO: 3 o los restos Kabat 24-33 de la SEQ ID NO: 4, 15 o 16, o una variante de la misma que contenga al menos una sustitución, inserción o supresión de aminoácidos en la unidad de unión L1;
- (ii) una unidad de unión L2 que comprende los restos Kabat 51-57 de la SEQ ID NO: 3 o los restos Kabat 49-55 de la SEQ ID NO: 4, 15 o 16, o una variante de la misma que contenga al menos una sustitución, inserción o supresión de aminoácidos en la unidad de unión L2;
- (iii) una unidad de unión L3 que comprende los restos Kabat 92-102 de la SEQ ID NO: 3 o los restos Kabat 88-96 de la SEQ ID NO: 4, 15 o 16, o una variante de la misma que contenga al menos una sustitución, inserción o supresión de aminoácidos en la unidad de unión L3;
- (iv) una unidad de unión H1 que comprende los restos Kabat 31-35 de la SEQ ID NO: 1 o los restos Kabat 31-35 de la SEQ ID NO: 2 o 14, o una variante de la misma que contenga al menos una sustitución, inserción o supresión de aminoácidos en la unidad de unión H1;
- (v) una unidad de unión H2 que comprende los restos Kabat 50-66 de la SEQ ID NO: 1 o los restos Kabat 50-65 de la SEQ ID NO: 2 o 14, o una variante de la misma que contenga al menos una sustitución, inserción o supresión de aminoácidos en la unidad de unión H2; y
- (vi) una unidad de unión H3 que comprende los restos Kabat 99-114 de la SEQ ID NO: 1 o los restos Kabat 98-108 de la SEQ ID NO: 2 o 14, o una variante de la misma que contenga al menos una sustitución, inserción o supresión de aminoácidos en la unidad de unión

Como alternativa, la proteína de unión a antígeno específica de IL-1b aislada comprende una cadena pesada y/o una cadena ligera en la que la cadena pesada comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 o 14; y en la que la cadena ligera comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia nucleotídica seleccionada entre la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4, 15 o 16.

Preferentemente, la proteína de unión a antígeno comprende o consiste en:

- (i) una cadena pesada de la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera de la SEQ ID NO: 3; o
- (ii) una cadena pesada de la SEQ ID NO: 2 o 14 y una cadena ligera de la SEQ ID NO: 4, 15 o 16.

Pueden seleccionarse los restos Kabat 88-96 de la SEQ ID NO: 4, 15 o 16 entre restos que consisten en el grupo seleccionado entre los aminoácidos 1-9 de la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 13.

Por último, en una alternativa adicional, la proteína de unión a antígeno aislada o fragmento de la misma comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad desde al menos el 50 %, al menos el 60 % al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % con la SEQ ID NO: 1, 2, 14, 3, 4, 15 o 16.

El segundo de dichos aspectos proporciona una proteína de unión a antígeno específica de IL-1 β aislada que neutraliza IL-1 β en un ensayo de estimulación celular a un valor de CI50 de menos de 20 nM, menos de 15 nM, menos de 10 nM, menos de 5 nM, menos de 3 nM, menos de 1 nM, menos de 0,5 nM o menos de 0,2 nM, o menos de aproximadamente 100 pM, menos de 50 pM, menos de 10 pM, menos de 5 pM o aproximadamente 1 pM.

El tercero de dichos aspectos prevé una proteína de unión a antígeno específica de IL-1 β aislada que inhibe la producción de IL-6 inducida por IL-1 β en un ensayo de inhibición celular a un valor de CI50 de menos de 20 nM, menos de 15 nM, menos de 10 nM, menos de 5 nM, menos de 4 nM, menos de 3 nM, menos de 1 nM, menos de 0,5 nM o menos de 0,4 nM; o menos de aproximadamente 300 pM, menos de aproximadamente 200 pM, menos de

aproximadamente 100 pM, menos de aproximadamente 50 pM, menos de aproximadamente 10 pM o menos de aproximadamente 5 pM.

5 El cuarto de dichos aspectos prevé una proteína de unión a antígeno específica de IL-1 β aislada que se une a IL-1 β con un valor KD de menos de 10 nM, menos de 5 nM, menos de 2 nM, menos de 1 nM, menos de 0,5 nM o menos de 0,1 nM.

10 En algunos casos, dicha proteína de unión a antígeno se une a la IL-1b humana y reacciona de forma cruzada con la IL-1b murina o de simio.

Por tanto, el quinto de dichos aspectos prevé una proteína de unión a antígeno específica de IL-1 β aislada que neutraliza la IL-1 β humana a un valor CI50 de 1 pM a 100 pM; o de 1 pM a 5 nM.

15 El sexto de estos aspectos prevé una proteína de unión a antígeno específica de IL-1 β aislada que neutraliza la IL-1 β murina a un valor CI50 de 100 pM a 1000 pM o de 100 pM a 15 nM.

El séptimo de dichos aspectos prevé una proteína de unión a antígeno específica de IL-1 β aislada en donde dicha proteína de unión tiene una afinidad (KD) con la IL-1 β humana de 1 pM a 100 pM.

20 El octavo de dichos aspectos prevé una proteína de unión a antígeno específica de IL-1 β aislada en donde dicha proteína de unión tiene una afinidad (KD) con la IL-1 β murina de 5 pM a 200 pM.

Aspectos generales de la divulgación

25 La siguiente sección proporciona detalles relevantes para reducir la invención a la práctica. La misma información puede usarse con respecto a las vías de desarrollo adicional analizadas en la sección anterior.

30 A menos que se haga referencia explícita a la materia objeto reivindicada, los elementos de la siguiente divulgación no han de considerarse parte de la invención.

Cuando la proteína de unión a antígeno específica de IL-1b aislada que se describe en el presente documento comprende una cadena pesada y/o una cadena ligera, la cadena pesada puede seleccionarse entre el grupo que consiste en cadenas pesadas α , δ , ϵ , γ y μ . Preferentemente la cadena pesada es γ .

35 La cadena ligera se selecciona preferentemente entre las cadenas ligeras A o k. Preferentemente la cadena ligera es λ .

Preferentemente, la proteína de unión a antígeno aislada que se desvela en el presente documento es un anticuerpo. Más preferentemente, el anticuerpo que se desvela es monoclonal, policlonal, biespecífico o heteroconjugado.

40 Preferentemente, el anticuerpo puede ser totalmente humano.

Preferentemente, la proteína de unión a antígeno aislada que se desvela en el presente documento es un anticuerpo seleccionado entre el subtipo IgG1, IgG2, IgG4 o IgG3.

45 Preferentemente, la proteína de unión a antígeno aislada que se desvela en el presente documento es un dominio variable único, un anticuerpo de dominio, un fragmento de unión a antígeno, un fragmento inmunológicamente eficaz, un Fv monocatenario, un diacuerpo o un anticuerpo biespecífico tetravalente (Tandab). Más preferentemente, el fragmento de unión a antígeno puede comprender una disposición de una o más CDR en armazones de proteínas no de anticuerpo, tales como un dominio.

50 Preferentemente, la proteína de unión a antígeno aislada que se desvela en el presente documento es recombinante.

55 Preferentemente, la proteína de unión a antígeno aislada que se desvela en el presente documento comprende un agente seleccionado entre el grupo que consiste en una molécula de inmunoadhesión, un agente de formación de imágenes, un agente terapéutico y un agente citotóxico.

60 Las moléculas de inmunoadhesión pueden comprender una o más de entre la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) de moléculas de adhesión celular (CAM), integrinas, cadherinas y selectinas.

En concreto, el agente de formación de imágenes que se desvela en el presente documento puede seleccionarse entre el grupo que consiste en un radiomarcador, una enzima, un marcador fluorescente, un marcador luminiscente, un marcador bioluminiscente, un marcador magnético y biotina.

65 Los ejemplos adecuados de radiomarcadores incluyen, pero sin limitación, 32-fósforo o tritio en forma de timidina tritiada.

Los ejemplos de marcadores fluorescentes adecuados incluyen cianina, fluoresceína, rodamina, flúor Alexa, flúor Dylight, Colorantes ATTO y Colorantes BODIPY.

5 Los ejemplos de marcadores luminiscentes adecuados incluyen marcadores quimioluminiscentes que incluyen, pero sin limitación, luminol y sondas de rutenio, y marcadores bioluminiscentes que incluyen, pero sin limitación, luciferina.

10 Preferentemente, el agente es un agente terapéutico o citotóxico. El agente terapéutico o citotóxico puede seleccionarse entre el grupo que consiste en un antimetabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citocina, un agente antiangiogénico, un agente antimitótico, una antraciclina, toxina y un agente apoptótico.

15 En el presente documento se proporciona la proteína de unión a antígeno aislada desvelada anteriormente para su uso en el tratamiento del cáncer, una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria seleccionada entre el grupo que consiste en artritis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, gota, diabetes, uveítis, síndromes periódicos asociados a criopirina y acné inflamatorio.

20 En el presente documento también se proporciona la proteína de unión a antígeno aislada desvelada anteriormente para su uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria seleccionada entre el grupo que consiste en artritis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, gota, diabetes, uveítis, síndromes periódicos asociados a criopirina y acné inflamatorio.

25 Los síndromes periódicos asociados a la criopirina pueden seleccionarse entre el síndrome autoinflamatorio familiar por frío (AAFF), el síndrome de Muckle-Wells (SMW) y la enfermedad inflamatoria multisistémica de inicio neonatal (EIMIN, también denominada síndrome neurológico cutáneo y articular infantil crónico o NCAIC).

30 Además, se proporciona una composición que comprende la proteína de unión a antígeno como se describe en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 La proteína de unión a antígeno que se desvela en el presente documento puede administrarse mediante inyección. En el caso de soluciones inyectables, el vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Puede conseguirse la prevención de la acción de microorganismos mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y/o antifúngicos. Los agentes adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, alcohol bencílico, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, puede ser preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol y cloruro de sodio en la composición. Puede lograrse la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

45 Pueden prepararse soluciones inyectables estériles mediante la incorporación del análogo en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguida de esterilización por filtración. En general, se preparan dispersiones mediante la incorporación del análogo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de entre los enumerados anteriormente.

50 Preferentemente, la composición farmacéutica puede incluir adicionalmente un tampón adecuado para minimizar la hidrólisis de ácido. Los agentes tamponantes adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, pero sin limitación, fosfatos, citratos, carbonatos y mezclas de los mismos.

55 Pueden realizarse administraciones únicas o múltiples de las presentes composiciones farmacéuticas. Un experto en la materia podría, mediante experimentación habitual, determinar niveles de dosis eficaces y atóxicos del presente compuesto y/o composición y un patrón de administración que sería adecuado para tratar las enfermedades y/o infecciones a las que los compuestos y las composiciones son aplicables.

60 Además, será evidente para un experto en la materia que el curso óptimo de tratamiento, tal como el número de dosis del presente compuesto o composición administrado por día durante un número definido de días, puede determinarse usando el curso convencional de ensayos de determinación de tratamiento.

65 En general, una dosis eficaz cada 24 horas puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,0001 mg a aproximadamente 1000 mg por kg de peso corporal; adecuadamente, de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 750 mg por kg de peso corporal; de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal; de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal; de

aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 250 mg por kg de peso corporal; o de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 250 mg por kg de peso corporal. Más adecuadamente, una dosis eficaz cada 24 horas puede estar en el intervalo de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 200 mg por kg de peso corporal; de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal; de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal; de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 25 mg por kg de peso corporal; de aproximadamente 5,0 mg a aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal; de aproximadamente 5,0 mg a aproximadamente 20 mg por kg de peso corporal; o de aproximadamente 5,0 mg a aproximadamente 15 mg por kg de peso corporal.

Como alternativa, una dosis eficaz puede ser de hasta aproximadamente 500 mg/m². Por ejemplo, en general, se espera que una dosis eficaz esté en el intervalo de aproximadamente 25 a aproximadamente 500 mg/m², de aproximadamente 25 a aproximadamente 350 mg/m², de aproximadamente 25 a aproximadamente 300 mg/m², de aproximadamente 25 a aproximadamente 250 mg/m², de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 mg/m² y de aproximadamente 75 a aproximadamente 150 mg/m².

La composición que se desvela en el presente documento puede comprender adicionalmente uno o más agentes terapéuticos como se describen en el presente documento.

También se proporciona una estirpe celular aislada que es capaz de producir la proteína de unión a antígeno como se describe en el presente documento.

Los ejemplos de estirpes celulares capaces de producir la proteína de unión a antígeno incluyen HEK293 y CHO.

También se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende o que consiste en secuencias que codifican proteínas de unión a antígeno que se desvelan en el presente documento, y fragmentos de las mismas, así como un vector que comprende dicho ácido nucleico.

El vector puede ser un plásmido o un virus. El experto en la materia apreciará que existen muchos vectores adecuados y están incluidos en el alcance de la presente divulgación.

Preferentemente, el vector comprende una secuencia de control de expresión unida operativamente a dicha molécula de ácido nucleico.

La secuencia de control de la expresión puede ser un fragmento de ácido nucleico que promueve, potencia o reprime la expresión de un gen o proteína de interés.

También se proporciona una célula hospedadora que comprende la molécula de ácido nucleico como se ha definido anteriormente.

La célula hospedadora puede ser una estirpe celular cultivada o una célula *ex vivo*. Preferentemente, la célula hospedadora comprende el vector como se describe en el presente documento.

También se proporciona un método para producir una proteína de unión a antígeno como se describe en el presente documento que comprende cultivar la célula hospedadora como se describe en el presente documento en condiciones adecuadas y recuperar dicha proteína a partir de la misma.

Se proporcionan usos médicos de la proteína de unión a antígeno aislada como se describe en el presente documento: son para su uso en un método de tratamiento del cáncer, una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria seleccionada entre el grupo que consiste en artritis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, gota, diabetes, uveítis, síndromes periódicos asociados a criopirina y acné inflamatorio.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la neutralización de IL-1 β mediante clones de Fab 1H y 2H. Se midió la neutralización de IL-1 β basándose en la densidad óptica (DO) leída a 655 nm y la concentración de Fab. Los resultados muestran que los clones 1H y 2H bloquean la activación de IL-1 β con una CI50 de 1,31 y 0,21, respectivamente.

La Figura 2 muestra los resultados de secuenciación de las cadenas pesadas y ligeras de los clones de Fab 1H y 2H.

La Figura 3 muestra la neutralización de IL-1 β humana mediante 1H y 2H de IgG1. Se midió la neutralización de IL-1 β basándose en la densidad óptica (DO) leída a 655 nm y la concentración de IgG. Los resultados muestran que los clones 1H y 2H neutralizan la IL-1 β humana con una potencia (CE50) de 2,6 nM y 0,17 nM, respectivamente.

La Figura 4 muestra la neutralización de IL-1 β de ratón mediante 1H y 2H de IgG1. Se midió la neutralización de

IL-1 β basándose en la densidad óptica (DO) leída a 655 nm y la concentración de IgG. Los resultados muestran que los clones 1H y 2H neutralizaron la IL-1 β de ratón con una potencia (CE50) de 11,5 nM y 1,5 nM, respectivamente.

5 La Figura 5 muestra que 1H y 2H de IgG inhiben la producción de IL-6 inducida por IL-1 β humana en células MRC5. La potencia neutralizante de IL-1 β humana se determinó midiendo el nivel de IL-6 producida en presencia de 1H y 2H IgG. Se estimularon células MRC5 mediante 4 pM de IL-1 β junto con diversas concentraciones de 1H y 2H de IgG. Los resultados muestran que 1H y 2H de IgG tienen una potencia de inhibición (CE50) de 3,92 nM y 0,35 nM, respectivamente.

10 La Figura 6 muestra que 2H de IgG inhibe la producción de IL-6 inducida por IL-1 β humana *in vivo* en ratones Balb/c. La potencia neutralizante de 2H de IgG se evaluó inyectando ratones por vía intraperitoneal con 4 o 20 mg/kg de 2H o 400 ml de PBS e IL-1 β humana o PBS al día siguiente. Se recogió la sangre y se midió la IL-6 mediante ELISA. Los resultados muestran que 2H de IgG fue capaz de inhibir la producción de IL-6 inducida por IL-1 β humana en ratones de una manera dependiente de la dosis.

15 La Figura 7 muestra que 2H de IgG es específica para la IL-1 β y no reconoce la IL-1 α . La especificidad de unión de 2H de IgG se determinó basándose en la densidad óptica (DO) a 460 nm y la concentración de 2H de IgG. Los resultados muestran que aunque la 2H de IgG se unió a la IL-1 β tanto humana como de ratón de una manera dependiente de la dosis, no pudo unirse a la IL-1 α humana o de ratón.

20 Las Figuras 8 y 9 muestran la potencia de neutralización de 5 clones de IgG obtenidos a partir de maduración de la afinidad de 2H de IgG. La potencia de neutralización se determinó basándose en la concentración de IL-6 secretada frente a la concentración de cada uno de los clones de IgG. Los resultados muestran que todos los clones de IgG maduros presentaron una potencia de neutralización alta para IL-1 β tanto de ratón como humana. Los resultados también muestran que los clones maduros fueron de 2 a 8 veces más eficaces para neutralizar IL-1 β de ratón (Figura 8) y de 3 a 23 veces más eficaces para neutralizar IL-1 β humana (Figura 9) que la 2H de IgG no madura.

25 La Figura 10 muestra la secuencia de P2D7KK. P2D7KK derivó de P2D7 cambiando un resto arginina y un resto serina por restos lisina (en negrita y subrayados) en las posiciones 75 y 81 de la región variable de la cadena pesada.

30 La Figura 11 muestra puntuaciones artríticas en ratones DBA después de la inducción de artritis con anticuerpos anti-colágeno. Se inyectó a los ratones isotipo 5 mg/kg, P2D7KK 5 mg/kg o P2D7KK 15 mg/kg. Los resultados muestran que los ratones tratados con P2D7KK tuvieron puntuaciones artríticas mucho más bajas que los ratones a los que se les inyectó el control de isotipo.

35 La Figura 12 muestra una hinchazón representativa de la pata delantera (parte superior) y trasera (parte inferior) después de la inducción de artritis y la administración de control de isotipo (izquierda), P2D7KK 5 mg/kg (centro) o P2D7KK 15 mg/kg (derecha). Los resultados muestran que P2D7KK contenía claramente inflamación ya que los ratones tratados con P2D7KK no experimentaron hinchazón de las patas en comparación con los ratones a los que se les inyectó el control de isotipo.

40 La Figura 13 muestra un análisis histológico representativo de articulaciones de las patas delanteras (parte superior) y traseras (parte inferior) de ratones a los que se les inyectó el anticuerpo de isotipo (izquierda) o tratados con 5 mg/kg (centro) o 15 mg/kg (derecha) de P2D7KK. Los resultados muestran que en ratones tratados con P2D7KK, las articulaciones permanecen virtualmente libres de infiltración de células inmunitarias, mientras que las articulaciones de ratones a los que se les inyectó isotipo fueron el sitio de una reacción altamente inflamatoria.

45 La Figura 14 muestra la infiltración de células inmunitarias en la cavidad peritoneal después de la inyección de PBS (1) o cristales de urato monosódico seguida de la administración de PBS (2), Anakinra 30 mg/kg (3), anticuerpo humano de isotipo 15 mg/kg (4), P2D7KK 5 mg/kg (5) o P2D7KK 15 mg/kg (6). Se muestran media β e.t.m. Ensayo t no apareado: * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; n.s. no significativo.

50 La Figura 15 muestra el crecimiento tumoral entre los días 7 y 17 después de la inoculación de células de carcinoma en ratones tratados con P2D7KK o con el control de isotipo. Se muestran las medias Θ DT, ensayo ANOVA de 2 vías (comparación múltiple de Turkey) * = p <0,05.

55 La Figura 16 muestra números absolutos de células en ganglios linfáticos con drenaje auricular de ratón. El gráfico 1 representa ratones no infectados con *P. acnes*; el gráfico 4 representa ratones infectados con *P. acnes* y a los que se les inyectó PBS; el gráfico 3 representa ratones infectados con *P. acnes* y a los que se les inyectó control de isotipo; el gráfico 2 representa ratones infectados con *P. acnes* y tratados con P2D7KK.

60 La Figura 17 muestra el número de linfocitos en la epidermis de ratones no infectados con *P. acnes* (primera barra desde la izquierda de cada grupo), infectados con *P. acnes* y a los que se les inyectó PBS (segunda barra desde

la izquierda de cada grupo), infectados con *P. acnes* y a los que se les inyectó control de isotipo (tercera barra desde la izquierda de cada grupo) o infectados con *P. acnes* y tratados con P2D7KK (cuarta barra desde la izquierda de cada grupo), los valores p se refieren a un ensayo t no apareado.

5 Ejemplos

Ejemplo 1 - Aislamiento de los anticuerpos anti-IL-1 β humana y caracterización de la capacidad de neutralización de IL-1 β en ensayos basados en células

10 Se aislaron anticuerpos anti-IL-1 β de una biblioteca de presentación de fagos de anticuerpos humanos (biblioteca Humanyx HX-02) a través de selección *in vitro*. Se identificaron inicialmente anticuerpos monoclonales específicos de IL-1 β en el formato de Fab mediante ELISA. Estos Fab positivos para ELISA se añadieron a células IL-1 β HEK-Blue™ (InvivoGen, EE.UU.), que es una estirpe celular HEK293 diseñada que sobreexpresa el receptor de IL-1 humano recombinante.

15 La unión de IL-1 β a su receptor IL-1R en la superficie de las células IL-1 β HEK-Blue™ desencadena una cascada de señalización que conduce a la activación de NF- κ B y la producción posterior de fosfatasa alcalina secretada (SEAP). La detección de SEAP en el sobrenadante de células IL-1 β HEK-Blue™ puede evaluarse fácilmente usando QUANTI-Blue™, un sustrato de SEAP colorimétrico. Las células HEK-Blue son sensibles a la IL-1B tanto humana como de ratón, pero son insensibles a la IL-1 α o el TNF- α humanos.

20 De los 22 Fab positivos para ELISA se descubrió que dos clones, 1H y 2H, bloquean la activación de las células HEK-Blue IL-1 β mediante estimulación de IL-1 β con CI_{50} (concentración que inhibe el 50 % de la actividad de IL-1 β) de 1,31 y 0,21 nM, respectivamente (Fig. 1). Los resultados de secuenciación revelaron que ambos clones poseían cadena ligera A. Se muestran secuencias de las cadenas pesadas y ligeras de clones 1H y 2H en la Fig. 2.

Ejemplo 2 - Neutralización de IL-1 β por 1H y 2H de IgG1 en el ensayo de células HEK-Blue

30 Los dos clones de Fab 1H y 2H se convirtieron en IgG de longitud completa amplificando las cadenas pesadas y ligeras de cada clon por separado mediante PCR y clonando en el vector de expresión de células de mamífero. Los plásmidos resultantes, con el subtipo de IgG1 humana, se usaron posteriormente para la expresión de anticuerpos de longitud completa mediante transfección transitoria en células de mamífero. Los anticuerpos se purificaron mediante columna de proteína G.

35 *IL-1 β humana*

La potencia neutralizante del clon de IgG 1H y 2H sobre IL-1 β humana se sometió a ensayo usando células HEK-Blue como se ha descrito anteriormente. Las células se estimularon con IL-1B humana 4 pM junto con diversas concentraciones del anticuerpo. La curva dosis-respuesta se ajustó mediante la ecuación de regresión no lineal sigmoidea (pendiente variable) a partir de la cual se calcula la CE_{50} (la concentración eficaz semimáxima). En este ensayo, los clones 1H y 2H neutralizaron la IL-1 β humana con una potencia (CE_{50}) de 2,6 nM y 0,17 nM, respectivamente (Fig. 3).

45 *IL-1 β de ratón*

La potencia neutralizante del clon de IgG 1H y 2H sobre IL-1 β de ratón se examinó usando células HEK-Blue como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, las células se estimularon con IL-1 β de ratón junto con diversas concentraciones del anticuerpo. En este ensayo, los clones 1H y 2H neutralizaron la IL-1 β de ratón con una potencia (CE_{50}) de 11,5 nM y 1,5 nM, respectivamente (Fig. 4).

50 Ejemplo 3 - Inhibición de la producción de IL-6 inducida por IL-1 β humana por 1H y 2H de IgG

In vitro

55 La inhibición de la producción de IL-6 inducida por IL-1 β humana por 1H y 2H de IgG se examinó *in vitro* usando la estirpe celular de fibroblastos humanos, MRC5. La estimulación de la célula de fibroblastos de pulmón humano, MRC5, por IL-1 β da como resultado la producción de IL-6.

60 La potencia neutralizante de IL-1 β humana de 1H y 2H de IgG se examinó midiendo el nivel de IL-6 producida en presencia de los anticuerpos. Las células se estimularon con IL-1 β humana junto con diversas concentraciones de los anticuerpos, y la IL-6 se cuantificó mediante ELISA. En este ensayo, 1H y 2H de IgG mostraron una potencia de inhibición (CE_{50}) de 3,92 y 0,35 nM, respectivamente (Fig. 5).

65 *In vivo*

La inhibición de la producción de IL-6 inducida por IL-1 β humana por 1H y 2H de IgG se examinó *in vivo* en ratones

Balb/C. A la administración de IL-1 β humana en ratones Balb/c le sigue una secreción rápida de IL-6 de ratón que es detectable en el suero mediante ELISA.

5 Para evaluar la potencia neutralizante de 2H de IgG, a los ratones se les inyectó por vía intraperitoneal 4 o 20 mg/kg de 2H o con 400 μ l de PBS. Al día siguiente, los ratones recibieron IL-1 β humana o PBS (control negativo). Dos horas después de la inyección de IL-1 β , se recogió sangre y se midió la IL-6 en el suero mediante ELISA.

10 Los resultados mostraron que 2H era capaz de inhibir la producción de IL-6 inducida por IL-1 β humana en ratones de una manera dependiente de la dosis (Fig. 6).

Ejemplo 4 - Especificidad de 2H de IgG

15 La especificidad de unión de 2H de IgG se examinó frente a los dos subtipos de IL-1, α y β , mediante ELISA directo. Los resultados muestran que aunque la 2H de IgG se unió a la IL-1 β tanto humana como de ratón de una manera dependiente de la dosis, no pudo unirse a la IL-1 α humana o de ratón en el intervalo de concentración sometido a ensayo (Fig. 7). Por tanto, 2H de IgG mostró una fuerte selectividad para IL-1 β sobre IL-1 α . En consecuencia, 2H de IgG es específica para IL-1 β y no reconoce IL-1 α .

20 Ejemplo 5 - Maduración de la afinidad de 2H de IgG

Se maduró la afinidad de 2H de IgG usando el método de presentación en fagos y se seleccionaron 5 clones maduros con mutaciones en la región CDR3 de la cadena ligera después del ensayo de neutralización de IL-1 β en células MRC5.

25 Todos los clones de IgG maduros presentaron una alta potencia de neutralización para la IL-1 β tanto de ratón como humana en este ensayo. Los clones maduros fueron de 2 a 8 veces más eficaces para neutralizar IL-1 β de ratón y de 3 a 23 veces más eficaces para neutralizar IL-1 β humana que la 2H de IgG inicial, con una potencia que varía entre CE₅₀ de 158,4 a 623,2 pM para la citocina de ratón (Fig. 8) y CE₅₀ de 6,5 a 45,3 pM para su homólogo humano (Fig. 9)

30 Los clones maduros (excepto P1E8) se sometieron a ensayo para determinar su afinidad hacia IL-1 β de ratón y humana usando el bioanalizador ProteOn (BioRad, Hercules, EE.UU.).

35 Los resultados mostraron que las afinidades por IL-1 β de ratón fueron de 3 a 13 veces mayores para los clones maduros en comparación con 2H de IgG y de 8 a 25 veces mayores con respecto a la IL-1 β humana (Tabla 1).

		Afinidad (KD) en pM	
		IL-16 de ratón	IL-16 humana
Ig original	2H	142	78,3
Ig madura	P2D7	10,9	3,1
	P2D8	16,6	4,57
	P1D9	23,6	6,73
	P1H8	48,9	10,1

Tabla 1: Afinidades de clones maduros hacia IL-16 humana y de ratón en comparación con 2H de IgG.

40 *Secuencias de clones con afinidad madura*

Los clones maduros se secuenciaron y las secuencias de aminoácidos de su región CDR3 de la cadena ligera se presentan en la Tabla 2.

Ig original	2H	QAWDSNIEV
Ig madura	P1D9	YAWDNAYEV
	P1E8	EAWDAAAEV
	P1H8	QAWADSFEV
	P2D7	YAWADTYEV
	P2D8	EAWADTYEV

Tabla 2: Secuencias de aminoácidos de la región CD3 de la cadena ligera de cada uno de los clones maduros.

5 Las secuencias de nucleótidos correspondientes de las regiones CDR3 de la cadena ligera después de la traducción inversa se presentan a continuación:

>2H

CAGGCGTGGGACAGCAACATTGAAGTA

A T TTCT T C G T
 A A A C
 C G G

(secuencia 2H original) (secuencias que codifican los mismos aminoácidos)

>P1D9

TATGCTTGGGATAATGCTTATGAAGTT

C C C C C G C
 A A A
 G G G

>P1E8

GAAGCTTGGGATGCTGCTGCTGAAGTT

G C C C C G C
 A A A A A
 G G G G G

>P1H8

CAAGCTTGGGCTGATTCTTTTGAAGTT

G C C CAGC C G C
 A A A A
 G G G G

>P2D7

TATGCTTGGGCTGATACTTATGAAGTT

C C C C C G C
 A A A A
 G G G G

>P2D8

GAAGCTTGGGCTGATACTTATGAAGTT

G	C	C	C	C	C	G	C
	A	A	A			A	
	G	G	G			G	

Ejemplo 6 - Eficacia *in vivo* de P2D7KK*Derivación de P2D7KK*

5 De los 5 clones con afinidad madura, se seleccionó P2D7 y se diseñó para que fuera un anticuerpo similar a la estirpe germinal, denominada P2D7KK. P2D7KK derivó de P2D7 cambiando un resto una arginina y un resto serina por restos lisina en las posiciones 75 y 81 de la región variable de la cadena pesada (Fig. 10).

10 Después, se sometió a ensayo la eficacia *in vivo* preliminar de P2D7KK en 4 modelos animales diferentes de enfermedad (1) AIAC: artritis inducida por anticuerpos de colágeno, un modelo de artritis reumatoide, (2) UMS: inflamación inducida por cristales de urato monosódico, un modelo que simula la gota, (3) CCR: crecimiento de carcinoma de células renales, para evaluar el uso de anticuerpo contra IL-1 β en el microentorno tumoral para inhibir el crecimiento tumoral y (4) *P. acnes*: un modelo de acné inflamatorio usando *Propionibacterium acnes*.

15 *AIAC - artritis inducida por anticuerpos de colágeno*

Se indujo artritis en ratones Balb/c mediante inyección intraperitoneal de 1,5 mg/ratón de cóctel de anticuerpos anti-colágeno el día 0, seguido de inyección de 25 mg de lipopolisacárido (LPS) el día 3.

20 Un grupo de 8 ratones recibieron 5 mg/kg de P2D7KK por vía intraperitoneal los días 2, 5 y 9. Otro grupo recibió 15 mg/kg de P2D7KK y un grupo de control recibió 5 mg/kg del control de isotipo siguiendo el mismo esquema.

25 Los resultados mostraron que los ratones tratados con P2D7KK tienen puntuaciones artríticas mucho más bajas que los ratones a los que se les inyectó el control de isotipo (Fig. 11). En consecuencia, la administración de P2D7KK inhibió el desarrollo de artritis.

30 Los resultados también mostraron que P2D7KK contenía claramente inflamación ya que los ratones tratados con P2D7KK no experimentaron hinchazón de las patas a diferencia de los ratones a los que se les inyectó un anticuerpo de isotipo (Fig. 12).

35 Los análisis histológicos de las patas traseras mostraron que, en ratones tratados con P2D7KK, las articulaciones permanecen virtualmente libres de infiltración de células inmunitarias, mientras que las articulaciones de ratones a los que se les inyectó isotipo fueron el sitio de una reacción altamente inflamatoria (Fig. 13).

40 *UMS - inflamación activada por cristales de urato monosódico*

A seis grupos de ratones C57/BL6 por vía intraperitoneal se les inyectaron 3 mg de urato monosódico en 200 ml de PBS, o PBS solo para el grupo de control. Después, a los ratones se les inyectó:

- 45 • P2D7KK 5 mg/kg en 300 ml de PBS (n = 5)
- P2D7KK 15 mg/kg en 300 ml de PBS (n = 4)
- Anticuerpo de isotipo 15 mg/kg en 300 ml de PBS (n = 5)
- Anakinra 30 mg/kg en 300 ml de PBS (n = 5)
- 300 ml de PBS (n = 3, grupo de control de vehículo)
- 50 • 300 ml de PBS (n = 5, sin grupo de control de UMS)

55 Seis horas después de la administración de anticuerpos, se sacrificaron los ratones y se lavó el peritoneo con 5 ml de medio completo frío. Se contaron los neutrófilos y los monocitos en el fluido de lavado mediante citometría de flujo.

Los resultados mostraron que la inyección de UMS en el peritoneo induce el reclutamiento de neutrófilos y monocitos. Al igual que Anakinra, P2D7KK fue capaz de reducir significativamente la infiltración de neutrófilos (tanto a 15 como

5 mg/kg) y monocitos (solo a 15 mg/kg) en la cavidad peritoneal (Fig. 14).

CCR - xenoinjerto de carcinoma de células renales humano

5 A ratones SCID hembra de 6-8 semanas de edad se les inyectaron por vía intramuscular 2×10^6 células RCC4. Después, un grupo de 6 ratones recibió 100 mg/ratón de P2D7KK inyectado en el sitio del tumor, los días 1, 3, 5, 7 y 9 después de la inoculación del tumor. Otro grupo de 6 ratones recibió el anticuerpo de control de isotipo.

10 El crecimiento tumoral se controló cada 2 días entre los días 7 y 17.

10 Los resultados mostraron que P2D7KK redujo significativamente el crecimiento tumoral en los ratones tratados (Fig. 15).

P. acnes - acné inflamatorio

15 A ratones C57/BL6 se les inyectaron por vía intraperitoneal 400 mg de P2D7KK o el control de isotipo el día -1 y el día 1. El día 0, se infectó a los ratones con 10^8 unidades formadoras de colonias de *Propionibacterium acnes* en el oído derecho y recibieron PBS en el oído izquierdo. Algunos ratones de control no se infectaron, algunos se infectaron, pero no recibieron ningún anticuerpo.

20 Se evaluaron parámetros inmunitarios en la dermis y en la epidermis los días 2, 5 y 9.

25 Los resultados mostraron que el día 9, P2D7KK redujo la inflamación como se observa por la disminución del número de células en los ganglios linfáticos (Fig. 16). Sin quedar ligados a teoría alguna, es probable que P2D7KK reduzca la infiltración de linfocitos en la epidermis (Fig. 17).

En consecuencia, P2D7KK mostró eficacia *in vivo* en 4 modelos diferentes de enfermedad humana, a saber, artritis reumatoide, gota, carcinoma de células renales y acné inflamatorio.

30 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Agencia de Ciencia, Tecnología e Investigación

35 <120> Anticuerpos contra IL-1B

<130> 9869SG1892

<160> 16

40 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 228

<212> PRT

45 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 798 110 T3

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

<210> 2
 <211> 222

ES 2 798 110 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

5

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

<210> 3

ES 2 798 110 T3

<211> 218
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 3

```

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 1           5           10           15

Thr Val Thr Ile Pro Cys Thr Ala Ser Ser Gly Ser Ile Ala Asn Asn
          20           25           30

Phe Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Thr Val
          35           40           45

Ile Tyr Glu Asp Ser Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Val Ser
 50           55           60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65           70           75           80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser
          85           90           95

Ala Asn Asp Arg Val Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Ile Val Leu
          100           105           110

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
          115           120           125

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
130           135           140

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
145           150           155           160

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
          165           170           175

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
          180           185           190

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
          195           200           205

Glu Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser
210           215
    
```

ES 2 798 110 T3

<210> 4
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Phe Ala
 20 25 30

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

Leu Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Leu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Asn Ile Glu Val
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn
 115 120 125

Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val
 130 135 140

Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu
 145 150 155 160

Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser
 165 170 175

Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser
 180 185 190

Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro
 195 200 205

Thr Glu Cys Ser
 210

ES 2 798 110 T3

5 <210> 5
 <211> 684
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

gaggtgcagc	tggtacagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaagggt	60
tcctgcaagg	catctggata	caccttcacc	agctactata	tgactgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagt	gatgggactt	gttgatcctg	aagatgggtga	aacaatatac	180
gcagagaagt	tccagggcag	agtcaccata	accgcgga	cgtctacaga	cacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gagagttgag	300
tgggtggctg	gtacggaagg	ttgggggtac	tactttgact	actggggcca	gggaaccctg	360
gtcaccgtct	caagcgcctc	caccaagggc	ccatcggctc	tccccctggc	accctcctcc	420
aagagcacct	ctgggggcac	agcggccctg	ggctgcctgg	tcaaggacta	cttccccgaa	480
ccggtgacgg	tgctcgtgaa	ctcagggcgc	ctgaccagcg	gcgtccacac	cttccccggt	540
gtcctacagt	cctcaggact	ctactccctc	agcagcgtag	tgaccgtgcc	ctccagcagc	600
ttgggcaccc	agacctacat	ctgcaacgtg	aatcacaagc	ccagcaacac	caaggtggac	660
aagaaagttg	agcccaaatac	ttgt				684

10 <210> 6
 <211> 666
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 6

caggtgcagc	tacagcagtg	gggocgagga	ctggtgaagc	cctcggagac	cctgtccctc	60
acctgcgctg	tctatggtgg	gtccttcagt	gattactact	ggagctggat	ccgccagccc	120
ccaggaagg	ggctagagtg	gattggggaa	atcgatcata	gtggaagcac	caactacaac	180
ccgtccctca	agagtcgagt	caccatatca	gtagacacgt	ccaggaacca	gttctccctg	240
agcctgagct	ctgtgaccgc	cgcggacacg	gctgtttatt	actgtgcgag	agcgtccccg	300

ES 2 798 110 T3

agcagtggct ggacccttga ctactggggc cagggcacc tggtcaccgt ctcaagcgcc 360
 tccaccaagg gcccatcggg cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
 aactcagggc ccctgaccag cggcgtccac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 540
 ctctactccc tcagcagcgt agtgaccgtg ccctccagca gcttggggcac ccagacctac 600
 atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660
 tcttgt 666

5 <210> 7
 <211> 654
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 7

aattttatgc tgactcagcc cactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtgaccatc 60
 ccctgcaccg ccagcagtgg cagcattgcc aacaactttg tgacgtggta ccagcagcgc 120
 ccgggcagtg cccccaccac tgtgatctat gaggatagtc aaagaccctc tggggtcctc 180
 gatcgggtct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga 240
 ctgaagactg aggacgaggc tgattattac tgtcagtctt atgatagtgc caatgacagg 300
 gtgacattcg gcggagggac caagctgatc gtcctcggtc agccaagge tgccccctcg 360
 gtcactctgt tcccgcctc ctctgaggag cttcaagcca acaaggccac actgggtgtgt 420
 ctcataagtg acttctaccg gggagccgtg acagtggcct ggaaggcaga tagcagcccc 480
 gtcaaggcgg gagtggagac caccacacc tccaaacaaa gcaacaacaa gtacgcggcc 540
 agcagctatc tgagcctgac gcctgagcag tggaaagccc acagaagcta cagctgccag 600
 gtcacgcatg aaggagcac cgtggagaag acagtggccc ctgcagaatg ctct 654

10
 15 <210> 8
 <211> 636
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 8

ES 2 798 110 T3

cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccagcatc 60
 acctgctctg gagataaatt gggggataaa tttgctttct ggtatcagca gaagccagggc 120
 cagtcccctg ttttggatcat ctatctagat aacaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggccttg 240
 gatgaggctg actactactg tcaggcgtgg gacagcaaca ttgaagtatt cggcggaggg 300
 accaagctga ccgtcctagg tcagcccaag gctgccccct cggtcactct gttcccgccc 360
 tcctctgagg agcttcaagc caacaaggcc aactgggtgt gtctcataag tgacttctac 420
 ccgggagctg tgacagtggc ctggaaggca gatagcagcc ccgtcaaggc gggagtggag 480
 accaccacac cctccaaaca aagcaacaac aagtacgcg gacagcagcta cctgagcctg 540
 acgcctgagc agtggaaagc ccacaaaagc tacagctgcc aggtcacgca tgaagggagc 600
 accgtggaga agacagtggc ccctacagaa tgttca 636

5 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 9

10 Tyr Ala Trp Asp Asn Ala Tyr Glu Val
 1 5

15 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 10

20 Glu Ala Trp Asp Ala Ala Ala Glu Val
 1 5

25 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 11

30 Gln Ala Trp Ala Asp Ser Phe Glu Val
 1 5

35 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12

ES 2 798 110 T3

Tyr Ala Trp Ala Asp Thr Tyr Glu Val
1 5

5 <210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 13
<210> 14
<211> 222
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 14

Glu Ala Trp Ala Asp Thr Tyr Glu Val
1 5

ES 2 798 110 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Asp His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Ala Ser Pro Ser Ser Gly Trp Thr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

<210> 15
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 15

ES 2 798 110 T3

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Phe Val
 20 25 30

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

Leu Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Leu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ala Trp Ala Asp Thr His Glu Val
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn
 115 120 125

Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val
 130 135 140

Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu
 145 150 155 160

Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser
 165 170 175

Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser
 180 185 190

Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro
 195 200 205

Thr Glu Cys Ser
 210

5 <210> 16
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 798 110 T3

<400> 16

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Ile Arg Asp Lys Phe Val
 20 25 30

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

Leu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Leu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ala Trp Ala Asp Thr His Glu Val
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn
 115 120 125

Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val
 130 135 140

Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu
 145 150 155 160

Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser
 165 170 175

Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser
 180 185 190

Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro
 195 200 205

Thr Glu Cys Ser
 210

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de unión a antígeno específica de IL-1 β aislada que comprende las siguientes CDR:

- 5 - una región variable de cadena pesada que incluye las CDR H1 = DYYWS, H2 = EIDHSGSTNYNPSLKS, H3 = ASPSSGWTLDY; y
 - una región variable de cadena ligera que incluye las CDR L1 = GDKLGDKFAF, L2 = LDNKRPS, L3 = YAWADTYEV.

10 2. La proteína de unión a antígeno aislada de la reivindicación 1, que comprende una cadena pesada y/o una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAYVGGFSFDYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSL KSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARASPSSGWTLDYWGQGT, y la cadena ligera comprende

15 QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKFAFWYQQKPGQSPVLVIYLDNKRPSGIPERFSGSN
 SGNTATLTISGTQALDEADYYCYAWADTYEVFGGGTK.

20 3. La proteína de unión a antígeno aislada de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha proteína es un anticuerpo; opcionalmente en donde dicho anticuerpo es monoclonal, policlonal, biespecífico, multiespecífico o heteroconjugado; opcionalmente en donde dicho anticuerpo es totalmente humano; opcionalmente en donde dicho anticuerpo es del subtipo IgG1, del subtipo IgG2, del subtipo IgG4 o del subtipo IgG3; opcionalmente en donde dicha proteína es un dominio variable único, un anticuerpo de dominio, un fragmento de unión a antígeno, un fragmento inmunológicamente eficaz, un Fv monocatenario, un diacuerpo o un anticuerpo biespecífico tetravalente (Tandab); opcionalmente en donde dicho fragmento comprende una cadena pesada que comprende la secuencia

25 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAYVGGFSFDYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNPSL KSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARASPSSGWTLDYWGQGT y una cadena ligera que comprende la secuencia

30 QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKFAFWYQQKPGQSPVLVIYLDNKRPSGIPERFSGSN
 SGNTATLTISGTQALDEADYYCYAWADTYEVFGGGTK.

35 4. La proteína de unión a antígeno aislada de cualquier reivindicación anterior, en donde la proteína es recombinante; opcionalmente en donde dicha proteína de unión comprende adicionalmente un agente seleccionado entre el grupo que consiste en una molécula de inmunoadhesión, un agente de formación de imágenes, un agente terapéutico y un agente citotóxico; opcionalmente en donde dicho agente es un agente de formación de imágenes seleccionado entre el grupo que consiste en un radiomarcador, una enzima, un marcador fluorescente, un marcador luminiscente, un marcador bioluminiscente, un marcador magnético y biotina; opcionalmente en donde dicho agente es un agente terapéutico o citotóxico seleccionado entre el grupo que consiste en un antimetabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citocina, un agente antiangiogénico, un agente antimitótico, una antraciclina, toxina y un agente apoptótico.

45 5. La proteína de unión a antígeno aislada de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso en el tratamiento del cáncer, una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria seleccionada entre el grupo que consiste en artritis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, gota, diabetes, uveítis, síndromes periódicos asociados a criopirina y acné inflamatorio.

50 6. Una composición que comprende la proteína de unión a antígeno aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 7. La composición de la reivindicación 6, que comprende adicionalmente uno o más agentes terapéuticos.

60 8. Un ácido nucleico aislado que codifica la proteína de unión a antígeno aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el ácido nucleico comprende una primera secuencia que codifica la región variable de la cadena pesada y una segunda secuencia que codifica la región variable de la cadena ligera de dicha proteína de unión a antígeno.

65 9. Un conjunto de dos ácidos nucleicos aislados que codifican juntos la proteína de unión a antígeno aislada de la reivindicación 1, en donde:

- el primer ácido nucleico comprende una secuencia que codifica la región variable de la cadena pesada de dicha proteína de unión a antígeno, y
- el segundo ácido nucleico comprende una secuencia que codifica la región variable de la cadena ligera de dicha proteína de unión a antígeno.

5
10. Un vector que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 8 o el conjunto de ácidos nucleicos de la reivindicación 9.

10
11. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 8 o el conjunto de ácidos nucleicos de la reivindicación 9, o el vector de la reivindicación 10.

15
12. Un método para producir la proteína de unión a antígeno aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende cultivar la célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 11 en condiciones adecuadas y recuperar dicha proteína de la misma.

Fig. 1

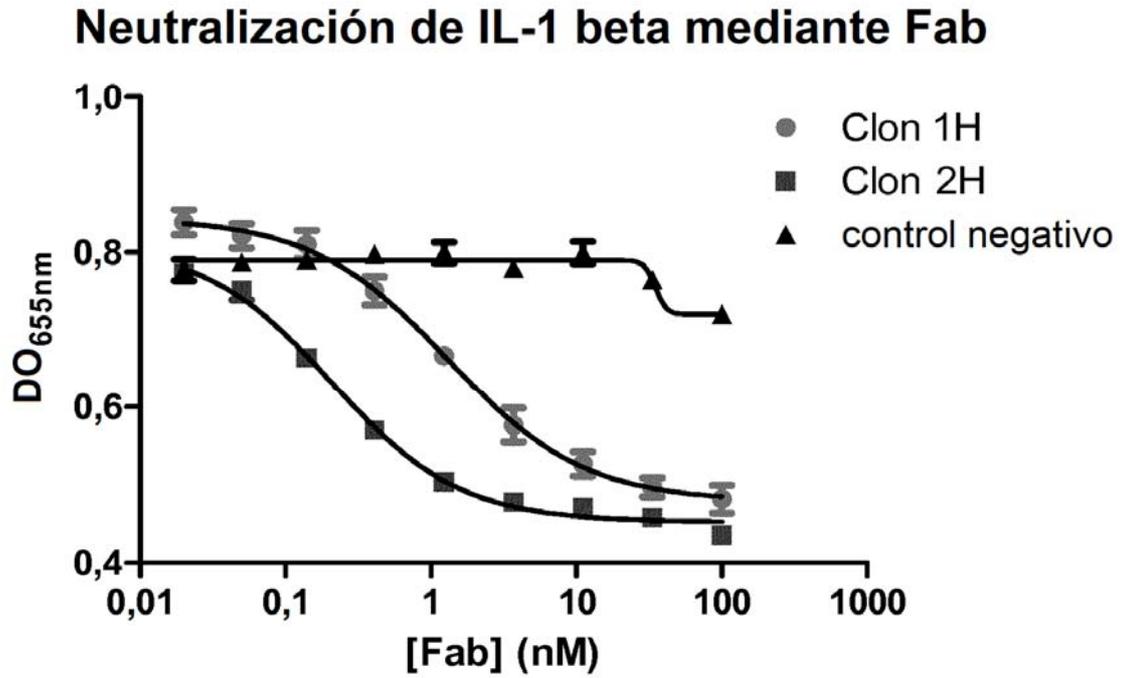


Fig. 2

1H_cadena ligera

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCTGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTGACCATCCC
CTGCACCCGCCAGCAGTGGCAGCATTGCCAACAACTTTGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCG
GGCAGTGCCCCCACCCTGTGATCTATGAGGATAGTCAAAGACCCTCTGGGGTCCCTGATCG
GGTCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACCTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGAAGAC
TGAGGACGAGGCTGATTACTGTGAGTCTTATGATAGTGCCAATGACAGGGTGACATTCGG
CGGAGGGACCAAGCTGATCGTCTCGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCC
CGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCT
ACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGG
AGACCACCACACCCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTG
ACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCA
CCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTGCAGAATGCTCT (SEQ ID NO: 7)

NFMLTQPHSVSESPGKTVTIPCTASSGSIANNFVQWYQQRPGSAPTTVIYEDSORPSGVPDRVSG
SIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYQCQSYDSANDRVTFGGGTKLIVLGQPKAAPSVTLFPPSPSEELQ
ANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTSPKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSY
SCQVTHEGSTVEKTVAPAECS (SEQ ID NO: 3)

1H_cadena pesada

GAGGTGCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTT
CCTGCAAGGCATCTGGATACACCTTCACCAGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCT
GGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGACTTGTTGATCCTGAAGATGGTGAAACAATATACGCAGA
GAAGTTCCAGGGCAGAGTCAACATAACCGCGGACACGTCTACAGACACAGCCTACATGGAGC
TGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGTTGAGTGGGTGGCT
GGTACGGAAGGTTGGGGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTC
AAGCGCCTCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTG
GGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTC
GTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTCCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAG
GACTCTACTCCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTAC
ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT
TGT (SEQ ID NO: 5)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGLVDPEDGETIYAEK
FQGRVTITADTSTDAYMELSSLRSEDVAVYYCARVEWVAGTEGWGYFDYWGQGLVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHFFPAVLQSSGLYSLSS
VVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (SEQ ID NO: 1)

2H_cadena ligera

CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCCGTGTCCCAGGACAGACAGCCAGCATCAC
CTGCTCTGGAGATAAATTGGGGATAAATTTGCTTTCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGTC
CCCTGTTTTGGTCATCTATCTAGATAACAAGCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGG
CTCCAACCTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTTTGGATGAGGCTG
ACTACTACTGTCAGGCGTGGGACAGCAACATTGAAGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACC
GTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCC GCCCTCCTCTGAGGAGCT
TCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCTGTGACAG
TGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTC AAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCAA
ACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGT
CCCACAAAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGC
CCCTACAGAATGTTCA (SEQ ID NO: 8)

QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKFAFWYQQKPGQSPVLVIYLDNKRPSGIPERFSGSN
SGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDSNIEVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKAT
LVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVT
HEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 4)

2H_cadena pesada

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCCTCGGAGACCCTGTCCCTCA
CCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCTTCAGTGATTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCCA
GGGAAGGGGGCTAGAGTGGATTGGGGAAATCGATCATAGTGGAAAGCACCACACTACAACCCGTC
CCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAGGAACCAGTTCTCCCTGAGCCTGA
GCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAGCGTCCCCGAGCAGTGG
CTGGACCCTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAG
GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC
TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGC
CCTGACCAGCGGCGTCCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCA
GCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAT
CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT (SEQ ID NO: 6)

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGFSFDYYWSWIRQPPGKLEWIGEDHSGSTNYNPSLK
SRVTISVDTSRNQFSLSLSSVTAADTAVYYCARSPSSGWTLDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC (SEQ ID NO: 2)

Fig. 3

**Neutralización de IL-1 beta humana
mediante 1H y 2H de IgG**

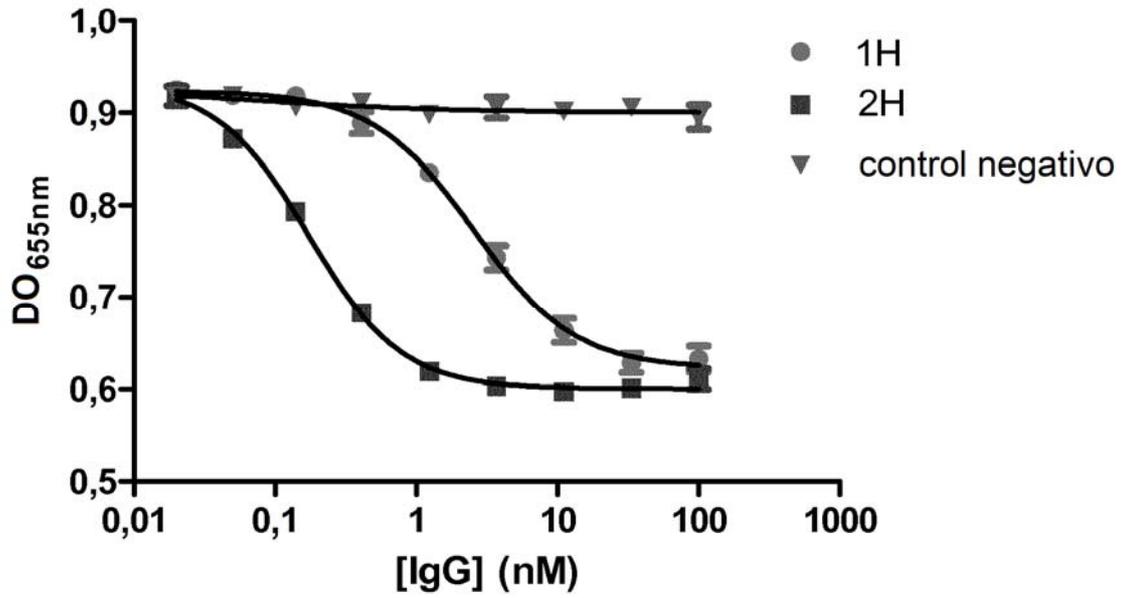


Fig. 4

**Neutralización de IL-1 beta de ratón
mediante 1H y 2H de IgG**

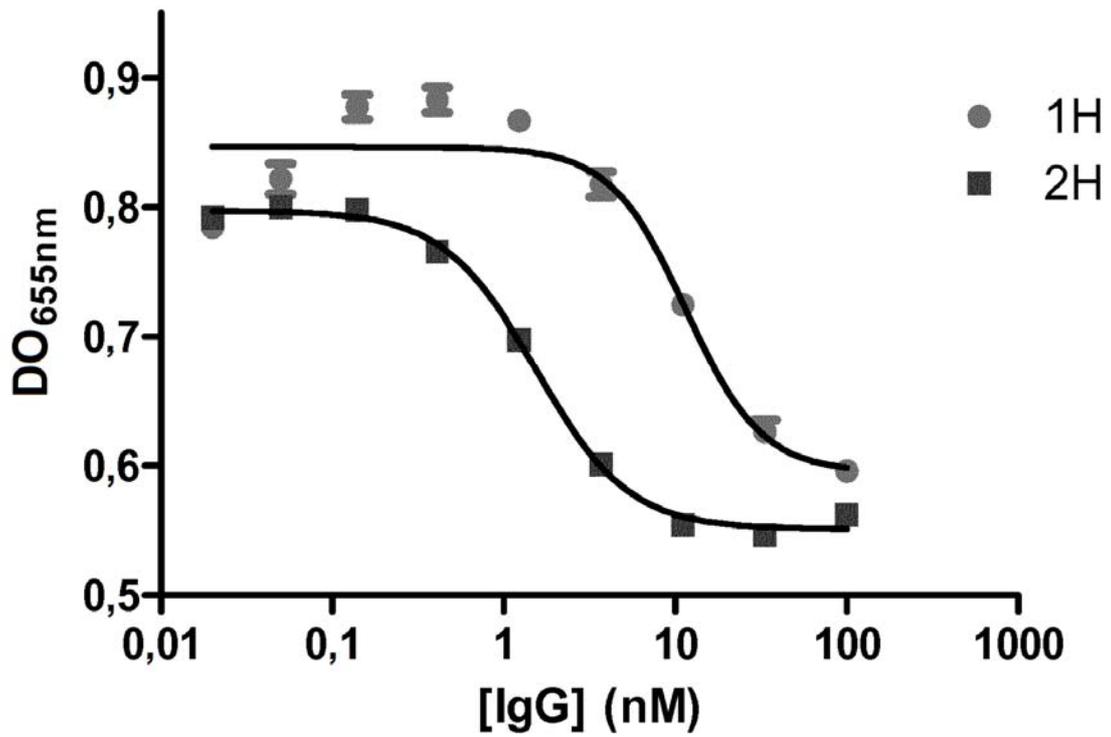


Fig. 5

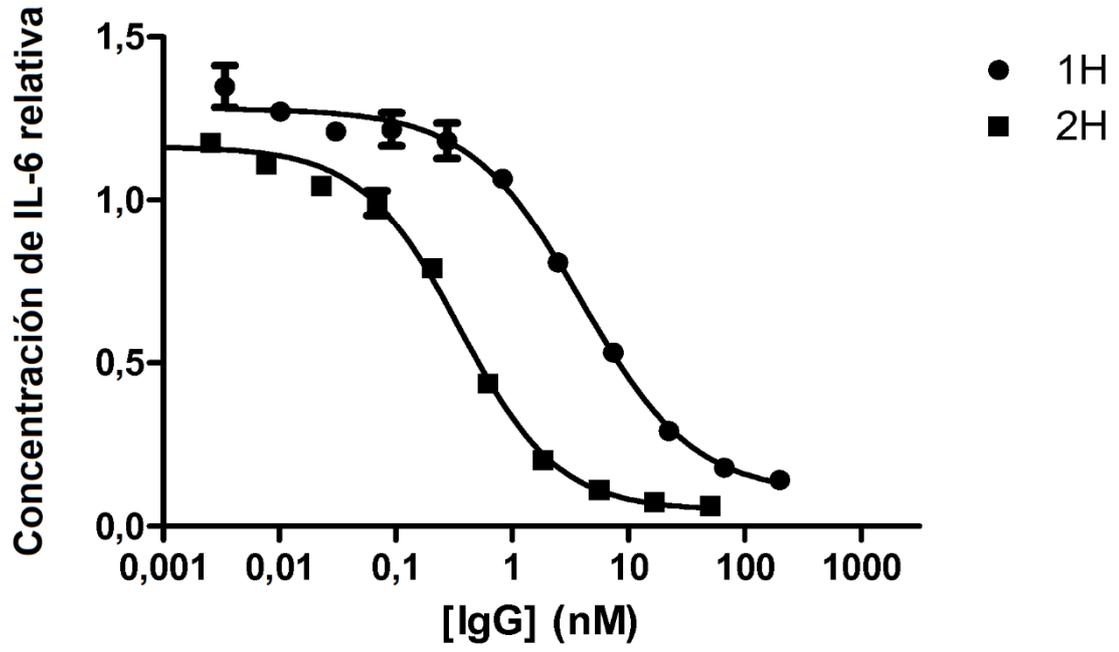


Fig. 6

Producción de IL-6 de ratón en respuesta a IL-1 β en ratones Balb/c

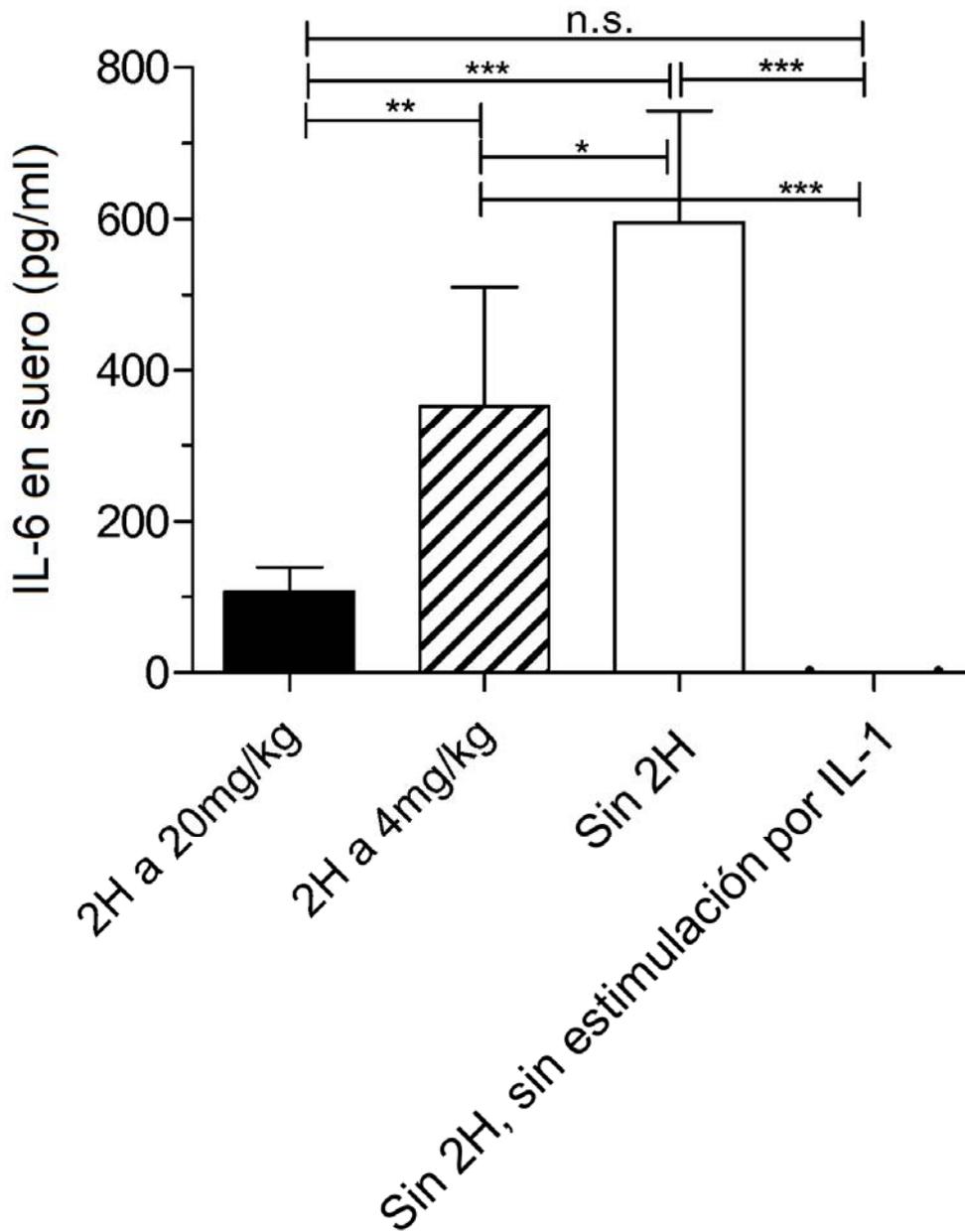


Fig. 7

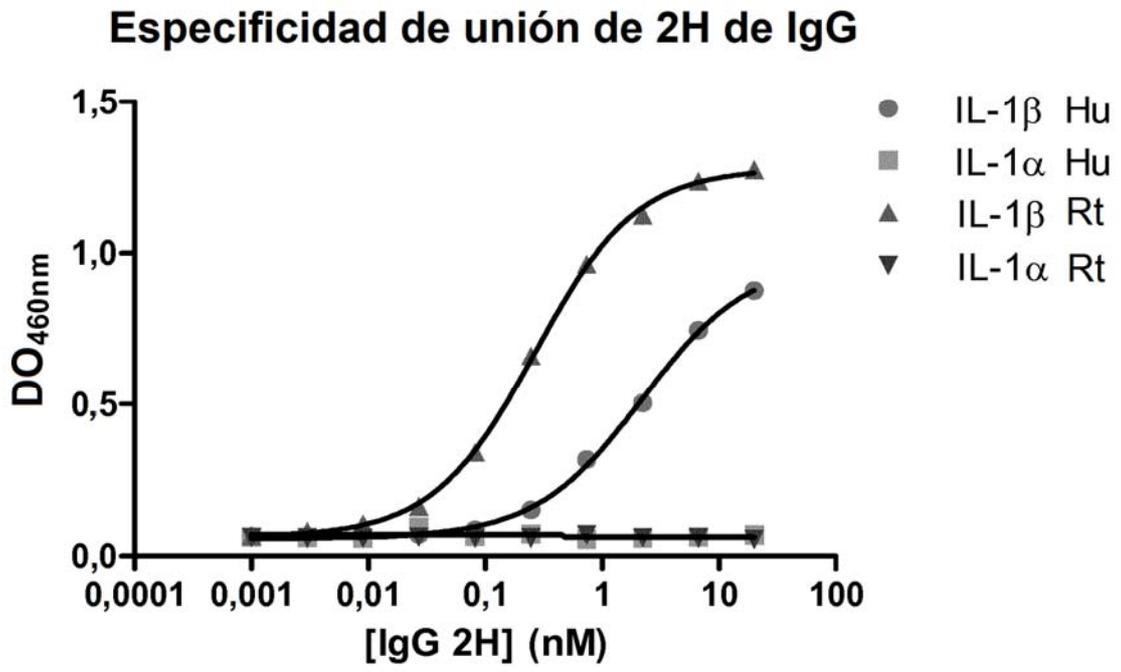
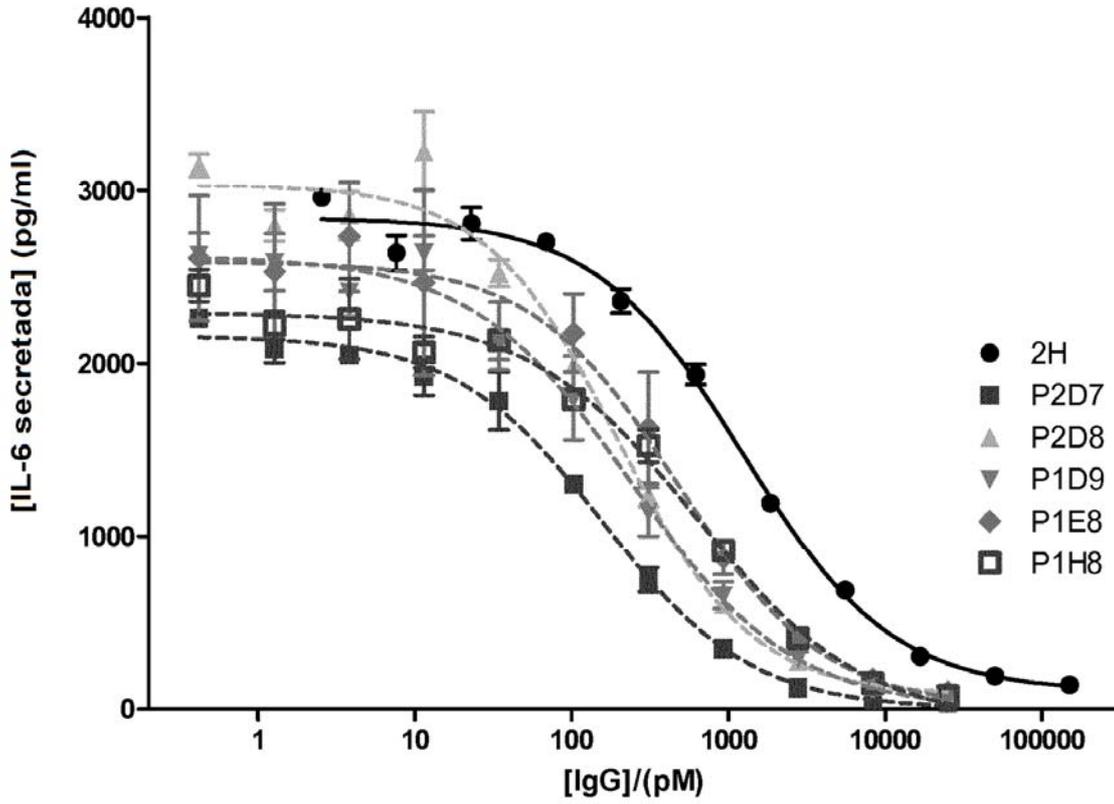


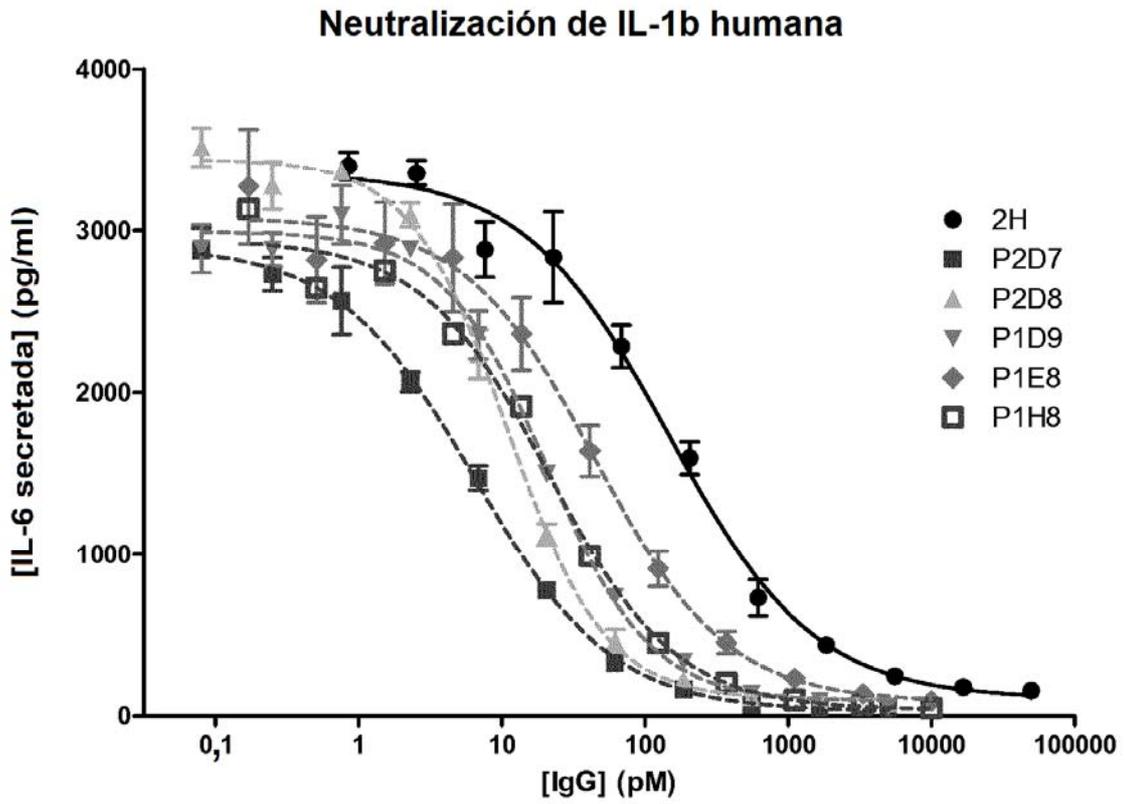
Fig. 8

Neutralización de IL-1b de ratón



	2H	P2D7	P2D8	P1D9	P1E8	P1H8
CE50	1246	158,4	197,4	240,9	479,1	623,2

Fig. 9



	2H	P2D7	P2D8	P1D9	P1E8	P1H8
EC50	147,9	6,533	10,99	20,71	45,33	21,48

Fig. 10

P2D7KK

- Región variable pesada:
QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYNP
SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSPSSGWTLDYWGQGTL

- Variable ligera (idéntica a P2D7):
QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKFAFWYQQKPGQSPVLVIYLDNKRPSGIPERFSG
SNSGNTATLTISGTQALDEADYYCYAWADTYEVFGGGTK

Con: CDR1, ---- CDR2, == CDR3.

Fig. 11

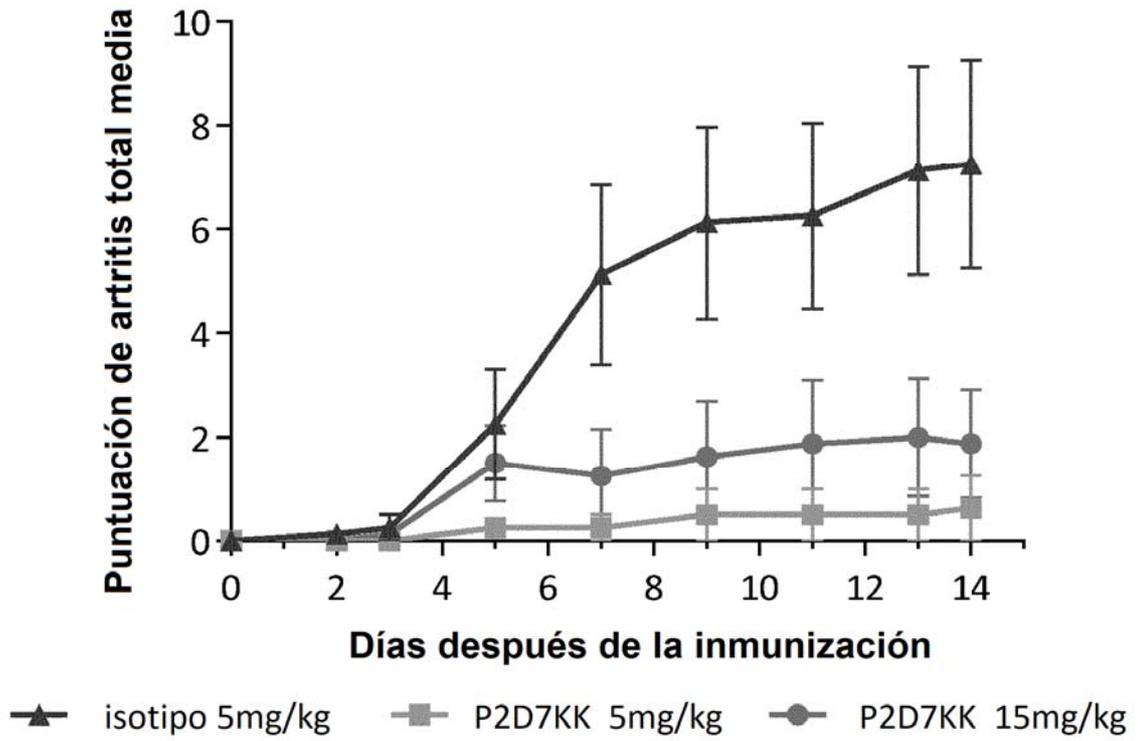


Fig. 12

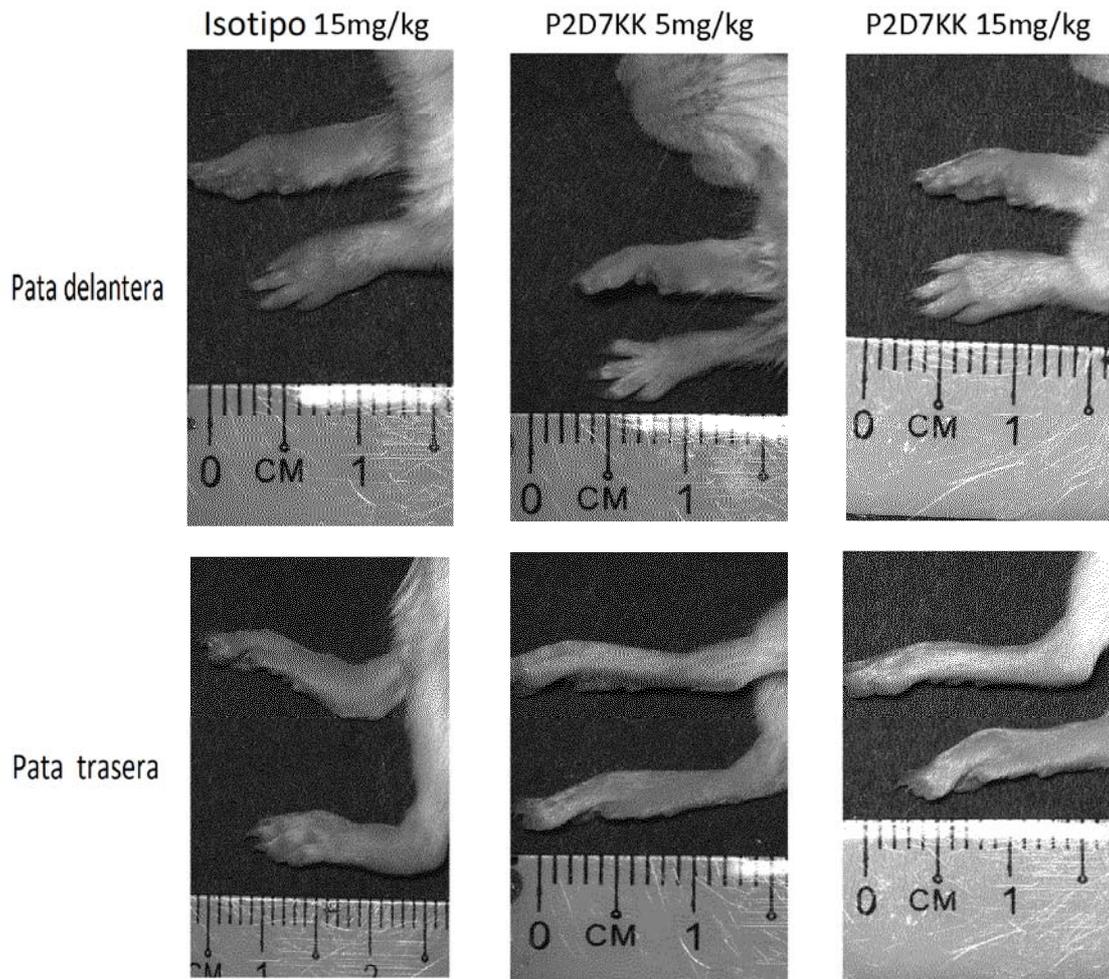


Fig. 13

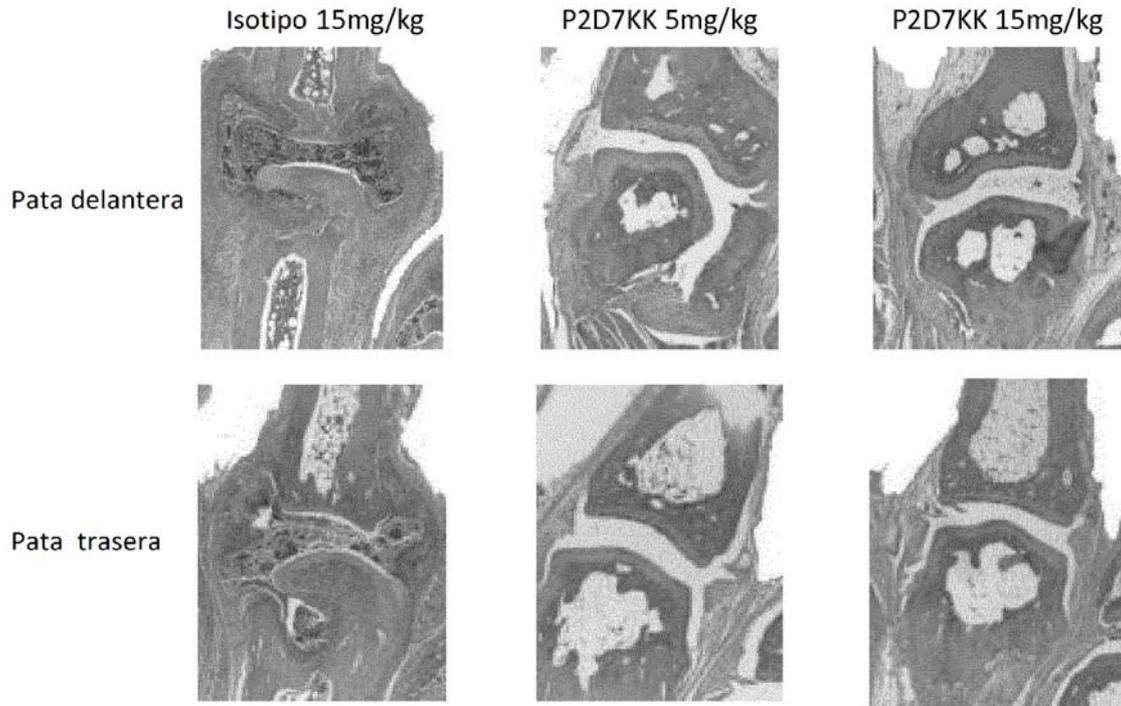


Fig. 14

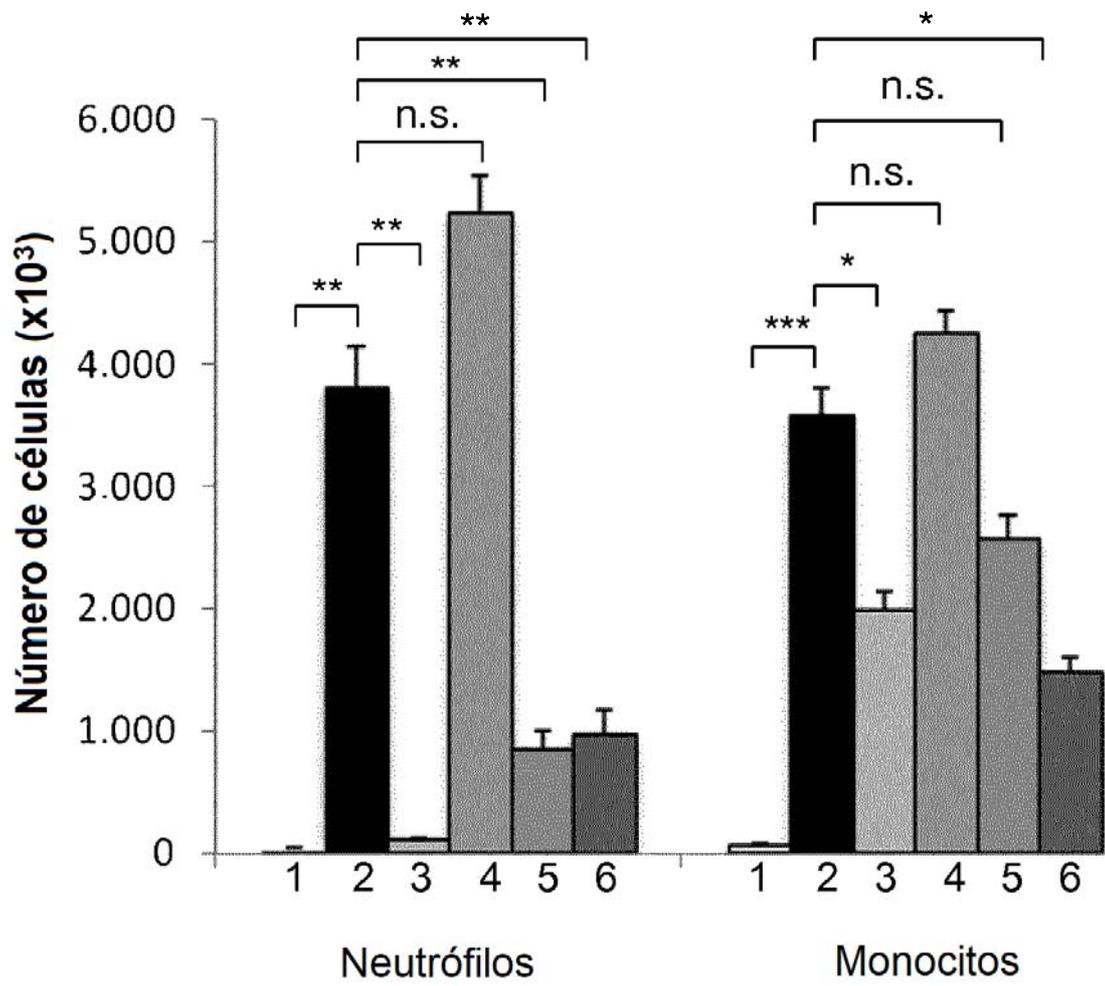


Fig. 15

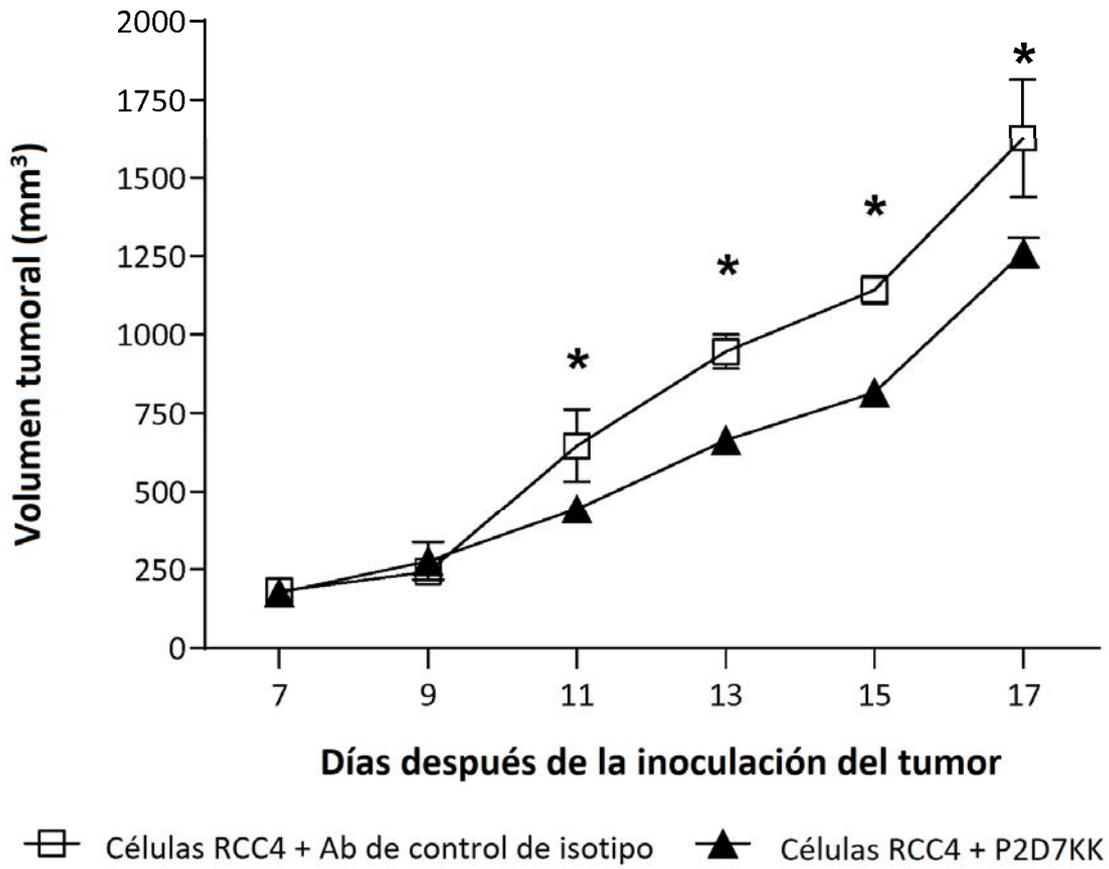


Fig. 16

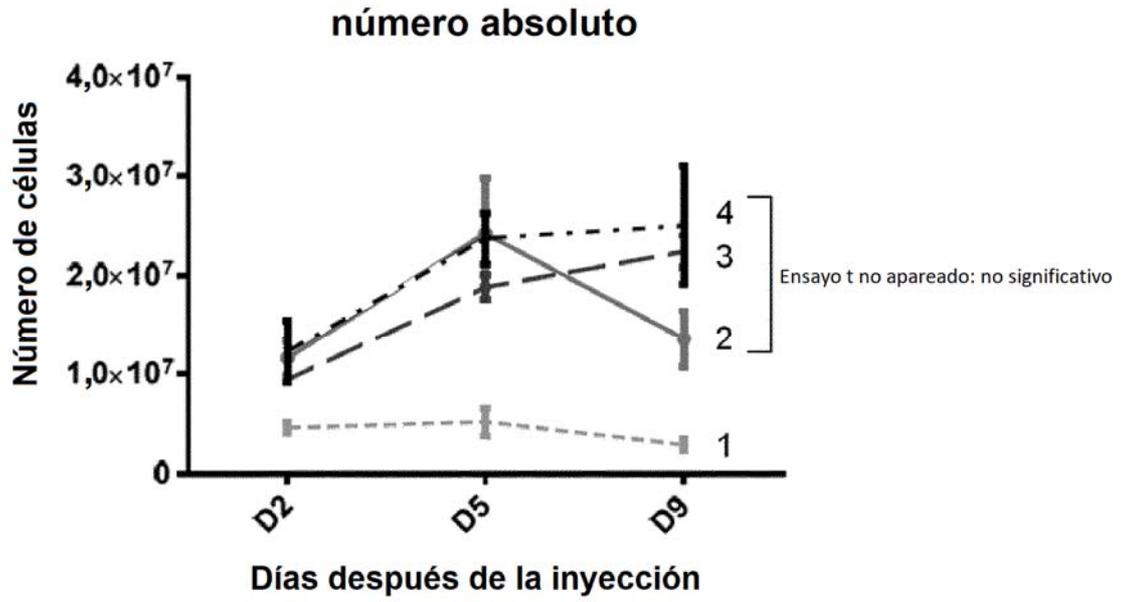


Fig. 17

