

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 305 110**

51 Int. Cl.:
C07K 16/24 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

- 96 Número de solicitud europea: **01976118 .8**
96 Fecha de presentación: **20.08.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1313769**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.05.2003**

54 Título: **ANTICUERPOS CONTRA IL-1 BETA HUMANA.**

30 Prioridad:
22.08.2000 GB 0020685

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.11.2008**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **13.03.2012**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **13.03.2012**

73 Titular/es:
**NOVARTIS AG
LICHTSTRASSE 35
4056 BASEL, CH**

72 Inventor/es:
**GRAM, Hermann y
DI PADOVA, Franco, E.**

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 305 110 T5

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra la il-1 beta humana

Esta invención se relaciona con anticuerpos de interleuquina I beta humana (IL-1 β) y con el uso de tales anticuerpos para el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por la IL-1.

5 La interleuquina 1 (IL-1) es una actividad producida por células del sistema inmune que actúa como un mediador de la respuesta inflamatoria en fase aguda. La producción excesiva o inapropiada de la IL-1, en particular de la IL-1 β , está asociada con la patología de diferentes enfermedades y trastornos, tales como septicemia, choque séptico o endotóxico, alergias, asma, pérdida de masa ósea, isquemia, derrame, artritis reumatoide y otros trastornos inflamatorios. Los anticuerpos para la IL-1 β . Los anticuerpos contra la IL-1 β han sido propuestos para ser utilizados en el tratamiento de
10 enfermedades y trastornos mediados por la IL-1; ver por ejemplo, WO 95/01997 y la discusión en la introducción de la misma.

Hemos preparado ahora anticuerpos mejorados de la IL-1 β humana para uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por la IL-1.

15 Por lo tanto, la invención provee una molécula de enlazamiento a la IL-1 β que comprende un sitio de enlazamiento del antígeno que incluye

a) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que comprende a las regiones hipervariables en secuencia CDR1, CDR2 y CDR3, dicha CDR1 teniendo la secuencia de aminoácidos Val-Tyr-Gly-Met-Asn, dicha CDR2 teniendo la secuencia de aminoácidos Ile-Ile-Trp-Tyr-Asp-Gly-Asp-Asn-Gln-Tyr-Tyr-Ala-Asp-Ser-Val-Lys-Gly, y dicha CDR3 teniendo la secuencia de aminoácidos Asp-Leu-Arg-Thr-Gly-Pro; y

20 b) un dominio variable de cadena liviana de inmunoglobulina (V_L) que comprende a las regiones hipervariables en secuencia CDR1', CDR2' y CDR3', dicha CDR1' teniendo la secuencia de aminoácidos Arg-Ala-Ser-Gln-Ser-Ile-Gly-Ser-Ser-Leu-His dicha CDR2' teniendo la secuencia de aminoácidos Ala-Ser-Gln-Ser-Phe-Ser y dicha CDR3' teniendo la secuencia de aminoácidos His-Gln-Ser-Ser-Ser-Leu-Pro y el equivalente directo de la misma en la cual las regiones hipervariables CDR1, CDR2, CDR3, CDR1', CDR2' y CDR3' tomadas como un todo son al menos 95% homólogas a la hipervariable bajo a) y b), y tienen una especificidad de enlazamiento por el epítipo antigénico de la IL-1 β que incluye al
25 bucle que incluye al residuo Glu 64 de la IL-1 β de 50 pM o menos.

A menos que se indique otra cosa, cualquier cadena de polipéptido es descrita aquí como teniendo una secuencia de aminoácidos que inicia en el extremo N-terminal y termina en el extremo C-terminal. El sitio de enlazamiento del antígeno comprende tanto a los dominios V_H como V_L; estos pueden estar localizados sobre la misma molécula de polipéptido o, preferiblemente, cada dominio puede estar sobre una cadena diferente, siendo el dominio V_H parte de una
30 cadena pesada de inmunoglobulina o fragmento de la misma y el dominio V_L parte de una cadena liviana de inmunoglobulina o fragmento de la misma.

Por "molécula de enlazamiento a la IL-1 β " se entiende cualquier molécula capaz de enlazarse al antígeno de la IL-1 β ya sea sola o asociada con otras moléculas. La reacción de enlazamiento puede ser mostrada por medio de métodos estándar (ensayos cualitativos) incluyendo, por ejemplo, un bioensayo para determinar la inhibición del enlazamiento a la IL-1 β a su receptor o a cualquier clase de ensayos de enlazamiento, con referencia a una prueba de control negativo en la cual se utiliza un anticuerpo de especificidad no relacionada pero del mismo isotipo, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25. Convenientemente, el enlazamiento de las moléculas de enlazamiento a la IL-1 β de la invención a la IL-1 β puede ser mostrada en un ensayo de enlazamiento competitivo.

40 Ejemplos de moléculas de enlazamiento del antígeno incluyen anticuerpos como los producidos por las células B o hibridomas y quiméricos, anticuerpos humanos o injertados a la CDR o cualquier fragmento de los mismos, por ejemplo fragmentos F(ab')₂ y Fab, así como anticuerpos de cadena sencilla o de un solo dominio.

Un anticuerpo de cadena sencilla consiste de dominios variables de cadenas liviana y pesada de un anticuerpo covalentemente enlazado por un enlazador peptídico que usualmente consiste desde 10 hasta 30 aminoácidos, preferiblemente desde 15 hasta 25 aminoácidos. Por lo tanto, Tal estructura no incluye la parte constante de las cadenas pesada y liviana y se cree que el espaciador peptídico más pequeño debe ser menos antigénico que una parte constante completa. Por "anticuerpo quimérico" se entiende un anticuerpo en el cual las regiones constantes de cadenas pesada y liviana o ambas son de origen humano mientras que los dominios variables de ambas cadenas pesada y liviana no son de origen humano (por ejemplo, de murido) o de origen humano pero derivados de un anticuerpo humano diferente. Por "anticuerpo injertado a CDR" se entiende un anticuerpo en el cual las regiones hipervariables (CDR) se derivan de un anticuerpo donante, tal como un anticuerpo no humano (por ejemplo, de murido) o un anticuerpo humano diferente, mientras que todas o sustancialmente todas las otras partes de la inmunoglobulina,
45
50

5 por ejemplo las regiones constantes y las partes altamente conservadas de los dominios variables, esto es, las regiones marco, se derivan de un anticuerpo aceptor, por ejemplo un anticuerpo de origen humano. Un anticuerpo injertado a CDR puede contener sin embargo unos pocos aminoácidos de la secuencia donadora en las regiones marco, por ejemplo en las partes de las regiones marco adyacentes a las regiones hipervariables. Por "anticuerpo humano" se entiende un anticuerpo en el cual las regiones constante y variable de ambas cadenas pesada y liviana son todas de origen humano, o sustancialmente idénticas a secuencias de origen humano, no necesariamente del mismo anticuerpo e incluyen anticuerpos producidos por ratones en los cuales los genes de la parte constante y variable de la inmunoglobulina de murino han sido reemplazados por sus contrapartes humanas, por ejemplo como se describe en términos generales en EP 0546073 B1, USP 5545806, USP 5569825, USP 5625126, USP 5633425, USP 5661016, 10 USP 5770429, EP 0 438474 B1 y EP 0 463151 B1.

Las moléculas de enlazamiento a la IL-1 β particularmente preferidas de la invención son anticuerpos humanos, especialmente el anticuerpo ACZ 885 como se describe aquí más adelante en los Ejemplos.

15 Por lo tanto, en anticuerpos quiméricos preferidos los dominios variables tanto de cadenas pesadas como livianas son de origen humano, por ejemplo aquellas del anticuerpo ACZ 885 que son mostradas en la Seq. Id. No. 1 y en la Seq. Id. No. 2. Los dominios de la región constante contienen también preferiblemente dominios adecuados de región constante humana, por ejemplo como se describe en "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat E.A. y colaboradores, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health.

20 Las regiones hipervariables pueden ser asociadas con cualquier clase de regiones marco, aunque preferiblemente son de origen humano. Las regiones marco adecuadas son descritas en Kabat E.A. y colaboradores, igual que la referencia anterior. El marco de cadena pesada preferido es un marco de cadena pesada humana, por ejemplo aquella del anticuerpo ACZ 885 que se observa en la Seq. Id. No. 1. Consiste de la secuencia de las regiones FR1, FR2, FR3 y FR4. En forma similar, Seq. Id. No. 2 muestra el marco de cadena liviana preferido de ACZ 885 que consiste, en secuencia, de las regiones FR1', FR2', FR3' y FR4'.

25 Por lo tanto, la invención también provee una molécula de enlazamiento a la IL-1 β que contiene al menos un sitio de enlazamiento para el antígeno que comprende ya sea un primer dominio que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a aquella mostrada en la Seq. Id. No. 1 que inicia con el aminoácido en posición 1 y termina con el aminoácido en posición 118 o un primer dominio como se describe más arriba y un segundo dominio que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a aquella mostrada en la Seq. Id. No. 2, que inicia con el aminoácido en posición 1 y termina con el aminoácido en posición 107.

30 Los anticuerpos monoclonales surgidos contra una proteína encontrada en forma natural en todos los humanos se desarrollan típicamente en un sistema no humano, por ejemplo en ratones, y por lo tanto son proteínas típicamente no humanas. Como consecuencia directa de esto, un anticuerpo xenogénico como el producido por un hibridoma, cuando se lo administra a humanos, provoca una respuesta inmune no deseable que es predominantemente mediada por la parte constante de la inmunoglobulina xenogénica. Esto limita claramente el uso de tales anticuerpos ya que ellos no pueden ser administrados durante un prolongado período de tiempo. Por lo tanto, se prefiere particularmente utilizar anticuerpos de cadena sencilla, de dominio sencillo, quiméricos, injertados a CDR, o especialmente humanos que probablemente no provoquen una respuesta alogénica sustancial cuando se los administra a humanos.

En vista de lo anterior, una molécula de enlazamiento a la IL-1 β más preferida de la invención es seleccionada de un anticuerpo anti-IL-1 β humano de acuerdo a la reivindicación 1.

40 Alternativamente, una molécula de enlazamiento a la IL-1 β de la invención puede ser seleccionada de una molécula de enlazamiento de cadena sencilla que incluye un sitio de enlazamiento del antígeno que comprende

a) un primer dominio que incluye en secuencia a las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3, teniendo dichas regiones hipervariables las secuencias de aminoácidos mostradas en la Seq. Id. No. 1,

45 b) un segundo dominio que incluye a las regiones hipervariables CDR1', CDR2' y CDR3' teniendo dichas regiones hipervariables las secuencias de aminoácidos mostradas en la Seq. Id. No. 2 y

c) un enlazador peptídico que está enlazado ya sea al extremo N-terminal del primer dominio y al extremo C-terminal del segundo dominio o al extremo C-terminal del primer dominio y al extremo N-terminal del segundo dominio;

y equivalentes directos de los mismos.

50 Como se sabe bien, los cambios menores en la secuencia de aminoácidos tales como la supresión, adición o sustitución de uno, unos pocos o incluso de varios aminoácidos puede conducir a una forma alélica de la proteína original que tiene sustancialmente propiedades idénticas.

De este modo, por el término "equivalentes directos de los mismos" se entiende cualquier molécula de enlazamiento a la IL-1 β que tiene al menos dos dominios por sitio de enlazamiento (molécula X') de acuerdo a la reivindicación 1.

5 La inhibición del enlazamiento a la IL-1 β a su receptor puede ser convenientemente probada en diferentes ensayos incluidos ensayos tales como los descritos aquí más adelante en el texto. Por el término "en el mismo grado" se entiende que las moléculas de referencia y las equivalentes exhiben, estadísticamente hablando, esencialmente curvas idénticas de inhibición del enlazamiento a la IL-1 β en uno de los ensayos a que se hace referencia más arriba. Por ejemplo, en las moléculas de enlazamiento a la IL-1 β de la invención, tienen típicamente los IC₅₀ para la inhibición del enlazamiento a la IL-1 β a su receptor que se encuentran típicamente dentro de +/-x5 de aquel de, preferiblemente sustancialmente lo mismo que, el IC₅₀ de la correspondiente molécula de referencia cuando se la analiza como se describió anteriormente.

10 Por ejemplo, el ensayo utilizado puede ser un ensayo de inhibición competitiva del enlazamiento a la IL-1 β por los receptores de la IL-1 soluble y las moléculas de enlazamiento a la IL-1 β de la invención.

Lo más preferiblemente, el anticuerpo contra la IL-1 β humana contiene al menos

15 a) una cadena pesada que incluye un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a aquella mostrada en la Seq. Id. No. 1 comenzando con el aminoácido en posición 1 y terminando con el aminoácido en posición 118 y la parte constante de una cadena pesada humana; y

b) una cadena liviana que incluye un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a aquella mostrada en la Seq. Id. No. 2 comenzando con el aminoácido en posición 1 y terminando con el aminoácido en posición 107 y la parte constante de una cadena liviana humana.

20 La parte constante de una cadena pesada humana puede ser de tipo γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , μ , α_1 , α_2 , δ o ϵ , preferiblemente del tipo γ , más preferiblemente del tipo γ_1 , mientras que la parte constante de una cadena liviana humana puede ser del tipo κ o λ , (que incluye a los subtipos λ_1 , λ_2 y λ_3) pero es preferiblemente del tipo κ . Las secuencias de aminoácidos de todas estas partes constantes se presentan en Kabat y colaboradores, igual que la referencia anterior.

25 Una molécula de enlazamiento a la IL-1 β de la invención puede ser producida por medio de técnicas de ADN recombinante. En vista de esto, se deben construir una o más moléculas de ADN que codifican a la molécula de enlazamiento, colocarlas bajo secuencias apropiadas de control y transferirlas dentro de un organismo huésped adecuado para expresión.

En una forma muy general, se provee por lo tanto el uso de moléculas de ADN de la invención para la producción de una molécula de enlazamiento a la IL-1 β de la invención por medio recombinante.

30 El estado del arte actual es tal que el trabajador capacitado en el arte es capaz de sintetizar las moléculas de ADN de la invención con base en la información suministrada aquí, esto es, las secuencias de aminoácidos de las regiones hipervariables y las secuencias de ADN que las codifican. Un método para construir un gen de dominio variable es descrito por ejemplo en EPA 239 400 y puede ser resumido de la siguiente manera: Se clona un gen que codifica a un dominio variable de un MAb de cualquier especificidad. Se determinan los segmentos de ADN que codifican a las regiones marco e hipervariable y se remueven los segmentos de ADN que codifican las regiones hipervariables para que los segmentos de ADN que codifican a las regiones marco se fusionen entre sí con sitios de restricción adecuados en las uniones. Los sitios de restricción se pueden generar en las posiciones apropiadas por mutagénesis de la molécula de ADN por medio de procedimientos estándar. Se preparan casetes de CDR bicatenarios sintéticos por medio de síntesis de ADN de acuerdo con las secuencias suministradas en la Seq. Id. No. 1 ó 2. Estos casetes son suministrados con extremos adhesivos para que puedan ser ligados a las uniones del marco.

35 Además, no es necesario tener acceso al ARNm de una línea celular productora de hibridoma con el propósito de obtener una construcción de ADN que codifica para las moléculas de enlazamiento a la IL-1 β de la invención. De este modo, la solicitud PCT WO 90/07861 proporciona instrucciones completas para la producción de un anticuerpo por medio de técnicas de ADN recombinante que proporcionan únicamente información escrita en cuanto a la secuencia de nucleótidos del gen. El método comprende la síntesis de una cantidad de oligonucleótidos, su amplificación por medio del método de la PCR, y su empalme para producir la secuencia deseada de ADN.

40 Los vectores de expresión que incluyen a un promotor adecuado o a genes que codifican partes constantes de cadena pesada y liviana están disponibles en forma pública. De esta forma, una vez se prepara una molécula de ADN de la invención, puede ser conveniente transferirla en un vector apropiado de expresión. Las moléculas de ADN que codifican anticuerpos de cadena sencilla pueden ser preparadas también por medio de métodos estándar, por ejemplo, como se describe en WO 88/1649.

En vista de lo anterior no es necesario el depósito de una línea celular o de hibridoma para cumplir con el criterio de suficiencia de descripción.

La invención incluye un vector de expresión que comprende una primera y una segunda construcciones de ADN para la producción de una molécula de enlazamiento a la IL-1 β como se describe más abajo:

5 La primera construcción de ADN codifica una cadena pesada o fragmento de la misma y comprende

a) una primera parte que codifica a un dominio variable que comprende alternativamente regiones marco e hipervariables, estando dichas regiones hipervariables en secuencia CDR1, CDR2 y CDR3 cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en la Seq. Id. No. 1; esta primera parte arranca con un codón que codifica al primer aminoácido del dominio variable y terminando con un codón que codifica al último aminoácido del dominio variable, y

10 b) una segunda parte que codifica a una parte constante de cadena pesada o fragmento de la misma que arranca con un codón que codifica al primer aminoácido de la parte constante de la cadena pesada y termina con un codón que codifica al último aminoácido de la parte constante o fragmento del mismo, seguido por un codón de detención.

15 Esta primera parte codifica a un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos como la mostrada en la Seq. Id. No. 1 comenzando con el aminoácido en posición 1 y terminando con el aminoácido en posición 118. Más preferiblemente la primera parte tiene la secuencia de nucleótidos como la mostrada en la Seq. Id. No. 1 comenzando con el aminoácido en posición 1 y terminando con el aminoácido en posición 354. Preferiblemente también, la segunda parte codifica la parte constante de una cadena pesada humana, más preferiblemente la parte constante de la cadena γ 1 humana. Esta segunda parte puede ser un fragmento de ADN de origen genómico (que comprende intrones) o un fragmento de ADNc (sin intrones).

20 La segunda construcción de ADN codifica a una cadena liviana o fragmento de la misma y comprende

a) una primera parte que codifica a un dominio variable que comprende alternativamente regiones marco e hipervariables; siendo dichas regiones hipervariables CDR3' y opcionalmente CDR1' y CDR2', cuyas secuencias de aminoácidos son mostradas en la Seq. Id. No. 2; esta primera parte arranca con un codón que codifica al primer aminoácido del dominio variable y terminando con un codón que codifica al último aminoácido del dominio variable, y

25 b) una segunda parte que codifica a una parte constante de cadena liviana o fragmento de la misma que arranca con un codón que codifica al primer aminoácido de la parte constante de la cadena liviana y termina con un codón que codifica al último aminoácido de la parte constante o fragmento del mismo, seguido por un codón de detención.

30 Esta primera parte codifica a un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos como la mostrada en la Seq. Id. No. 2 comenzando con el aminoácido en posición 1 y terminando con el aminoácido en posición 107. Más preferiblemente, la primera parte tiene la secuencia de nucleótidos como la mostrada en la Seq. Id. No. 2 comenzando con el nucleótido en posición 1 y terminando con el nucleótido en posición 321. Preferiblemente también, la segunda parte codifica la parte constante de una cadena liviana humana, más preferiblemente la parte constante de la cadena κ humana.

35 La invención también incluye moléculas de enlazamiento a la IL-1 β en las cuales uno o más de los residuos de CDR1, CDR2, CDR3, CDR1 CDR2' o CDR3' o los marcos, típicamente únicamente 1 ó 2, son cambiados de los residuos mostrados en la Seq Id No. 1 y en la Seq. Id. No. 2; por ejemplo por mutación, por ejemplo por mutagénesis dirigida al sitio de las secuencias correspondientes de ADN. La invención incluye las secuencias de ADN que codifican para tales moléculas cambiadas de enlazamiento a la IL-1 β . En particular la invención incluye moléculas de enlazamiento a la IL-1 β en las cuales uno o dos residuos de CDR1' o CDR2' han sido cambiados de los residuos mostrados en la Seq. Id. No. 2.

40 En la primera y segunda construcciones de ADN, la primera y segunda partes pueden ser separadas por medio de un intrón, y, se puede ubicar convenientemente un reforzador en el intrón entre la primera y la segunda partes. La presencia de tal reforzador que es transcrita pero no traducida, puede ayudar en una transcripción eficiente. En modalidades particulares, la primera y la segunda construcciones de ADN incluyen al reforzador de un gen de cadena pesada convenientemente de origen humano.

45 Cada una de las construcciones de ADN se coloca bajo el control de secuencias adecuadas de control, en particular bajo el control de un promotor adecuado. Se puede utilizar cualquier tipo de promotor, siempre y cuando se adapte al organismo huésped en el cual se transferirán las construcciones de ADN para expresión. Sin embargo, si la expresión tiene lugar en una célula de mamífero, se prefiere particularmente el uso del promotor de un gen que codifica para inmunoglobulina.

5 El anticuerpo deseado puede ser producido en un cultivo celular o en un animal transgénico. Un animal transgénico adecuado puede ser obtenido de acuerdo con métodos estándar que incluyen microinyecciones dentro de óvulos de la primera y segunda construcciones de ADN colocadas bajo secuencias de control adecuadas que transfieren los óvulos así preparados dentro de hembras seudopreñadas apropiadas y seleccionar un descendiente que exprese el anticuerpo deseado.

Cuando se producen las cadenas de anticuerpo en un cultivo celular, se deben insertar primero las construcciones de ADN ya sea dentro de un vector único o dentro de dos vectores de expresión compatibles pero separados, siendo esta última probabilidad la preferida.

10 Por lo tanto, la invención también provee un vector de expresión capaz de replicarse en una línea celular procariota o eucariota que incluye al menos una de las construcciones de ADN anteriormente descrita.

15 Cada vector de expresión que contiene una construcción de ADN es luego transferido dentro de un organismo huésped adecuado. Cuando se insertan separadamente las construcciones de ADN sobre dos vectores de expresión, se las puede transferir separadamente, esto es, un tipo de vector por célula, o transferir en forma conjunta, siendo preferida esta última posibilidad. Un organismo huésped adecuado puede ser una bacteria, una levadura o una línea celular de mamífero, siendo esta última la preferida. Más preferiblemente, la línea celular de mamífero es de origen linfocítico, por ejemplo un mieloma, hibridoma o una célula B normal inmortalizada, que convenientemente no expresa ninguna cadena liviana o pesada de anticuerpo endógeno.

20 Para expresión en células de mamífero se prefiere que la secuencia que codifica la molécula de enlazamiento a la IL-1 β se integre dentro del ADN de la célula huésped dentro de un locus que permite o favorece la expresión de alto nivel de la molécula de enlazamiento a la IL-1 β . Las células en las cuales la secuencia de codificación de la molécula de enlazamiento a la IL-1 β se integra dentro de tales loci favorables pueden ser identificadas y seleccionadas sobre la base de los niveles de la molécula de enlazamiento a la IL-1 β que ellas expresan. Se puede utilizar cualquier marcador seleccionable adecuado para la preparación de células huésped que contienen la secuencia de codificación de la molécula de enlazamiento a la IL-1 β ; por ejemplo, se puede utilizar un gen dhfr /metotrexato o sistema de selección equivalente. Los sistemas alternativos para expresión de las moléculas de enlazamiento a la IL-1 β de la invención incluyen sistemas de amplificación/selección basados en GS, tales como aquellos descritos en EP 0256055 B, EP 0323997 B y en la solicitud de patente europea 89303964.4.

25 En un aspecto adicional de la invención se provee un proceso para la producción de una molécula de enlazamiento a la IL-1 β que comprende (i) cultivar un organismo que es transformado con un vector de expresión como se definió anteriormente y (ii) recuperar la molécula de enlazamiento a la IL-1 β del cultivo.

30 De acuerdo con la presente invención se ha encontrado que el anticuerpo ACZ 885 parece tener especificidad de enlazamiento por el epítipo antigénico de la IL-1 β humana que incluye al bucle que contiene al residuo de Glu 64 de la IL-1 β humana madura. (El residuo de Glu 64 de la IL-1 β humana madura corresponde al residuo 180 del precursor de la IL-1 β humana.) Este epítipo parece estar por fuera del sitio de reconocimiento del receptor de la IL-1 y es por lo tanto más sorprendente que los anticuerpos para este epítipo, por ejemplo el anticuerpo ACZ 885, sean capaces de inhibir el enlazamiento a la IL-1 β a su receptor. Los anticuerpos, en particular los anticuerpos quiméricos y los injertados a CDR y especialmente los anticuerpos humanos, que tienen especificidad de enlazamiento por el epítipo antigénico de la IL-1 β humana madura que incluyen al bucle que contiene al residuo de Glu 64 y que es capaz de inhibir el enlazamiento a la IL-1 β a su receptor; y el uso de tales anticuerpos para el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por la IL-1, son nuevos y están incluidos dentro del alcance de la presente invención.

En aún un aspecto adicional, la invención incluye:

35 i) el uso de un anticuerpo contra la IL-1 β de la invención, que tiene especificidad de enlazamiento del antígeno para un epítipo antigénico de la IL-1 β humana madura que incluye al bucle que contiene Glu 64 y que es capaz de inhibir el enlazamiento a la IL-1 β a su receptor, para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediados por IL-1;

45 ii) una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo contra la IL-1 β de la invención, que tiene especificidad de enlazamiento del antígeno por un epítipo antigénico de la IL-1 β madura humana que incluye al bucle que contiene Glu 64 y que es capaz de inhibir el enlazamiento a la IL-1 β a su receptor, en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable, diluyente o portador; y

50 iii) el uso de un anticuerpo contra la IL-1 β de la invención, que tiene especificidad de enlazamiento del antígeno para un epítipo antigénico de la IL-1 β humana madura que incluye al bucle que contiene Glu 64 y que es capaz de inhibir el enlazamiento a la IL-1 β a su receptor, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediados por IL-1.

Para los propósitos de la presente descripción un anticuerpo es "capaz de inhibir el enlazamiento a la IL-1 β " si el anticuerpo es capaz de inhibir el enlazamiento a la IL-1 β a su receptor sustancialmente en la misma medida que el anticuerpo ACZ 885, en donde "en el mismo grado" tiene el significado que se definió anteriormente.

5 De este modo ACZ 885 tiene una constante de equilibrio de disociación K_D para el enlazamiento a IL-1 β aproximadamente menor a 50 μ M, por ejemplo aproximadamente 35 μ M. Esta alta afinidad de enlazamiento hace al anticuerpo ACZ particularmente adecuado para aplicaciones terapéuticas.

10 Se divulga un anticuerpo contra la IL-1 β que tiene un K_D para enlazamiento a la IL-1 β aproximadamente de 50 μ M o menor. Este aspecto también incluye el uso de métodos y composiciones para tales anticuerpos de alta afinidad, como se describió anteriormente para anticuerpos contra la IL-1 β que tienen especificidad de enlazamiento por un determinante antigénico de la IL-1 β humana madura que incluye al bucle que contiene Glu 64.

En la presente descripción la frase "enfermedad mediada por IL-1" abarca a todas las enfermedades y condiciones médicas en las cuales IL-1 juega un papel, ya sea directamente o indirectamente, en la enfermedad o condición médica, incluida la causa, el desarrollo, progreso, persistencia o patología de la enfermedad o condición.

15 En la presente descripción los términos "tratamiento" o "cura" se refieren tanto a tratamiento profiláctico o preventivo así como curativo o tratamiento para modificar una enfermedad, incluido el tratamiento de un paciente en riesgo de contraer la enfermedad o que se sospecha que ha contraído la enfermedad así como pacientes que están enfermos o que han sido diagnosticados por padecer una enfermedad o condición médica, e incluye la eliminación de la recaída clínica.

Los anticuerpos de la invención están definidos en las reivindicaciones.

20 Convenientemente, los Anticuerpos de la Invención son anticuerpos humanos, más preferiblemente el anticuerpo ACZ 885 o equivalente directo del mismo.

Los Anticuerpos de la Invención bloquean los efectos de la IL-1 β sobre sus células objetivo y por lo tanto son indicadas para uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por IL-1. Estas y otras actividades farmacológicas de los Anticuerpos de la Invención pueden ser demostradas en métodos estándar de análisis por ejemplo como se describe más abajo:

25 Neutralización de la producción de PGE₂ que depende de la IL-1 β y de interleuquina-6 por medio de fibroblastos humanos primarios

La producción de PGE₂ y de IL-6 en fibroblastos dérmicos humanos primarios depende de la IL-1 β . El TNF- α solo no puede inducir en forma eficiente a estos mediadores inflamatorios, pero se sinergizan con IL-1. Los fibroblastos dérmicos primarios son utilizados como un modelo sustituto para la activación celular inducida por IL-1.

30 Los fibroblastos humanos primarios son estimulados con IL-1 β recombinante o con medio acondicionado obtenido a partir de los PBMC humanos estimulados con LPS con en presencia de diferentes concentraciones de Anticuerpo de la Invención o IL-1RA en el rango entre 6 y 18.000 μ M. Se utiliza el anticuerpo quimérico anti-CD25 Simulect® (basiliximab) como un isótopo de control acoplado. Se toma el sobrenadante después de 16 h de estimulación y se analizó la IL-6 por medio de ELISA. Los Anticuerpos de la Invención típicamente tienen valores de IC₅₀ para la inhibición de la producción de IL-6 aproximadamente de 1 nM o menores (por ejemplo aproximadamente desde 0,1 hasta aproximadamente 1 nM) cuando se analizaron como anteriormente.

Como se indicó en el ensayo anterior, los Anticuerpos de la Invención bloquean potencialmente los efectos de la IL-1 β . Por lo tanto, los Anticuerpos de la Invención tienen utilidad farmacéutica de la siguiente forma:

40 Los Anticuerpos de la Invención son útiles para la profilaxis y tratamiento de enfermedades o condiciones médicas mediadas por la IL-1, por ejemplo condiciones inflamatorias, alergias y condiciones alérgicas, reacciones de hipersensibilidad, enfermedades autoinmunes, infecciones severas, y rechazo de trasplantes de órganos o tejidos.

45 Por ejemplo, se pueden utilizar los Anticuerpos de la Invención para el tratamiento de receptores de corazón, pulmón, corazón - pulmón combinados, hígado, riñón, trasplantes pancreáticos, de piel o de córnea, incluido el rechazo de tejidos u órganos de individuos de la misma especie o rechazo de un trasplante de otro animal, y para la prevención de enfermedades por rechazo del injerto contra el huésped, tal como después de un trasplante de médula ósea, y de arterosclerosis asociada con un trasplante de órgano.

Los Anticuerpos de la Invención son particularmente útiles para el tratamiento, prevención, o mejora de una enfermedad autoinmune y de condiciones inflamatorias, en particular condiciones inflamatorias con una etiología que incluye un componente autoinmune tal como artritis (por ejemplo artritis reumatoide, artritis crónica progresiva y artritis deformante)

5 y enfermedades reumáticas, incluidas las condiciones inflamatorias y las enfermedades reumáticas que involucran pérdida de masa ósea, dolor inflamatorio, hipersensibilidad (incluida tanto la hipersensibilidad de las vías respiratorias como la hipersensibilidad dérmica) y las alergias. Las enfermedades autoinmunes específicas por las cuales se pueden emplear los Anticuerpos de la Invención incluyen trastornos hematológicos autoinmunes (incluyen, por ejemplo, anemia hemolítica, anemia aplásica, anemia de glóbulos rojos puros y trombocitopenia idiopática), lupus eritematoso sistémico, policondritis, escleroderma, granulomatosis de Wegener, dermatomiositis, hepatitis crónica activa, miastenia grave, psoriasis, síndrome de Steven-Johnson, psilosis idiopática, enfermedad autoinmune inflamatoria de los intestinos (incluyendo, por ejemplo, la colitis ulcerativa, la enfermedad de Crohn y el Síndrome de Intestino Irritable), oftalmopatía endocrina, enfermedad de Graves, sarcoidosis, esclerosis múltiple, cirrosis biliar primaria, diabetes juvenil (diabetes mellitus tipo I), uveítis (anterior y posterior), queratoconjuntivitis seca y queratoconjuntivitis vernal, fibrosis pulmonar intersticial, artritis sorriática y glomerulonefritis (con y sin síndrome nefrótico, por ejemplo incluido el síndrome nefrótico idiopático o la nefropatía de cambio mínimo).

Los Anticuerpos de la Invención son también útiles para el tratamiento, prevención, o mejoría del asma, bronquitis, neumoconiosis, enfisema pulmonar, y otras enfermedades obstructivas o inflamatorias de las vías respiratorias.

15 Los Anticuerpos de la Invención son útiles para el tratamiento de reacciones agudas indeseables y reacciones inflamatorias hiperagudas que son mediadas por la IL-1 o que involucran la producción de la IL-1, especialmente la IL-1 β , o la promoción de la liberación de TNF por la IL-1, por ejemplo infecciones agudas, por ejemplo choque séptico (por ejemplo, choque endotóxico y síndrome de angustia respiratoria en adultos), meningitis, neumonía; y quemaduras severas; y para el tratamiento de caquexia o síndrome debilitante asociado con la liberación mórbida de TNF, consecuente con infección, cáncer, o disfunción orgánica, especialmente caquexia relacionada con SIDA, por ejemplo, asociada con o consecuencial con infección por VIH.

Los Anticuerpos de la Invención son particularmente útiles para el tratamiento de enfermedades del metabolismo óseo incluyendo osteoartritis, osteoporosis y otras artritis inflamatorias, y pérdida de masa ósea en general, incluida la pérdida de masa ósea relacionada con la edad, y en particular con enfermedad periodontal.

25 Para estas indicaciones, la dosis apropiada, desde luego, variará dependiendo, por ejemplo, del Anticuerpo particular de la Invención empleado, del huésped, de la forma de administración y de la naturaleza y severidad de la condición que está siendo tratada. Sin embargo, en uso profiláctico, generalmente se indica que se obtienen resultados satisfactorios con dosis aproximadamente entre 0,05 mg hasta aproximadamente 10 mg por kilogramo de peso corporal, más usualmente aproximadamente desde 0,1 mg hasta aproximadamente 5 mg por kilogramo de peso corporal. La frecuencia de dosificación para usos profilácticos estará normalmente en el rango aproximadamente desde una vez por semana hasta aproximadamente una vez cada tres meses, más usualmente en el rango aproximadamente desde una vez cada 2 semanas hasta aproximadamente una vez cada 10 semanas, por ejemplo una vez cada 4 a 8 semanas. El Anticuerpo de la Invención se administra convenientemente en forma parenteral, intravenosa, por ejemplo en la vena antecubital u otra vena periférica, en forma intramuscular, o subcutánea. Un tratamiento profiláctico típicamente comprende la administración del Anticuerpo de la Invención una vez por mes hasta una vez cada 2 a 3 meses, o menos frecuentemente.

40 Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden fabricar en forma convencional. Una composición de acuerdo con la invención se suministra preferiblemente en forma liofilizada. Para administración inmediata se disuelve en un excipiente acuoso adecuado, por ejemplo agua estéril para inyección o solución salina fisiológica amortiguada estéril. Si se considera deseable elaborar una solución de volumen mayor para administración por medio de infusión en vez de como inyección de bolo, es conveniente incorporar albúmina de suero humano o la propia sangre heparinizada del paciente en la solución salina al momento de la formulación. La presencia de un exceso de tal proteína fisiológicamente inerte evita la pérdida de anticuerpo por adsorción sobre las paredes del contenedor y del tubo utilizado con la infusión de la solución. Si se utiliza albúmina, una concentración adecuada es desde 0,5 hasta 4,5% en peso de la solución salina.

La invención es descrita además a manera de ilustración en los siguientes Ejemplos que se refieren a la Figura acompañante que muestra las curvas de respuesta a la dosis para la inhibición del enlazamiento a la IL-1 β por medio de los receptores solubles I y II de la IL-1.

EJEMPLOS

50 Se utilizan los ratones transgénicos modificados genéticamente para expresar el repertorio de IgG/k humana en vea del repertorio de inmunoglobulina de múrido (Fishwild y colaboradores, 1996, Nat Biotechnol., **14**, 845-851) para generar anticuerpos para la IL-1 β humana. Se inmortalizan las células B de estos ratones por medio de tecnología estándar de hibridoma y se obtienen células de hibridoma de múrido que segregan al anticuerpo de IgG1/k humano ACZ 885

Ejemplo 1: Generación del hibridoma y purificación del anticuerpo

Los ratones genéticamente modificados 18077 (Medarex Inc. Annadale, NJ) se inmunizan con la IL-1 β recombinante humana acoplada a KLH (50 μ g) en forma subcutánea en diferentes sitios en adyuvante. Se le administran al ratón cinco refuerzos adicionales con esta inyección tres días antes de la fusión. El día de la fusión se sacrifica al ratón 18077 por medio de inhalación de CO₂ y se fusionan las células del bazo (4,1 x 10⁷) por medio de un método de rutina utilizando PEG 4000 con un número igual de células PAI-O, una línea celular de mieloma de ratón. Las células fusionadas se siembran en placa en 624 pozos (1 ml/pozo) que contienen una capa alimentadora de células peritoneales de ratón (ratones Balb C), en RPMI 1640 suplementado con HAT, suero fetal de ternera al 10% inactivado con calor 5 x 10⁻⁵ M en β -mercaptoetanol. Se recolectan los sobrenadantes y se analizan por ELISA y se seleccionan los anticuerpos monoclonales reactivos a la IL-1 β . Se identificaron cinco anticuerpos monoclonales de la subclase IgG/k. La clonación se hace utilizando 4 placas de microtitulación de 96 pozos, sembrando 0,5 células por pozo. Después de dos semanas se inspeccionan los pozos con un microscopio invertido. Se recoge el sobrenadante de los pozos positivos para crecimiento y se evalúa la producción de anticuerpos monoclonales anti-IL-1 β por medio de ELISA. Se preparan 1-2 L de sobrenadante acondicionado de cuatro subclones del hibridoma originalmente identificado # 657 y se purifican los anticuerpos por medio de cromatografía de afinidad sobre una columna de proteína A.

15 Pureza y secuencias parciales de aminoácidos de cadena liviana y pesada

Secuenciación de aminoácidos

Se separan las cadenas liviana y pesada del anticuerpo purificado ACZ 885 por medio de SDS-PAGE y se determinan los aminoácidos amino-terminales por medio de la degradación de Edman. La pureza de los anticuerpos usados en estos estudios es \geq 90% por secuenciación. Las secuencias de ADNc que codifican para los dominios variables de cadena liviana y pesada se obtienen por medio de amplificación por PCR del ADNc obtenido a partir del ARNm de las células clonadas de hibridoma y se las secuencia completamente. Las secuencias amino-terminales de los dominios variables de cadena liviana y pesada y las correspondientes secuencias de ADN se dan en la Seq. Id no. 1 y en la Seq Id No. 2 más abajo, en las cuales las CDR se muestran en negrilla.

Seq. Id. No. 1 de la región variable de cadena Pesada de ACZ885

```

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTCGTTGCTCTTTAAGAGGTGCCAGTGTCCAG
-19 M E F G L S W V F L V A L L R G V Q C Q - 1
GTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCC
V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S - 21
TGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTGTATTATGGCATGAAGTGGGTCGCCAGGCTCCA
C A A S G F T F S V Y G M N W V R Q A P - 41
GGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATTTGGTATGATGGAGATAATCAATACTATGCA
G K G L E W V A I I W Y D G D N Q Y Y A - 61
GACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTG
D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L - 81
CAAATGAACGGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTATTGTGCGAGAGATCTTAGG
Q M N G L R A E D T A V Y Y C A R D L R - 101
ACTGGGCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACCGTCTCCTC
T G P F D Y W G Q G T L V T V S S - 118
    
```

25

Seq. Id. No. 2 de la región variable de cadena Liviana de ACZ885

```

ATGTTGCCATCACAACTCATTGGGTTTCTGCTGCTCTGGGTTCCAGCCTCCAGGGGTGAA
-19 M L P S Q L I G F L L L W V P A S R G E - 1

ATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAGGAGAAAGTCACCATC
I V L T Q S P D F Q S V T P K E K V T I - 21

ACCTGCCGGGCCAGTCAGAGCATTGGTAGTAGCTTACACTGGTACCAGCAGAAACCAGAT
T C R A S Q S I G S S L H W Y Q Q K P D - 41

CAGTCTCAAAGCTCCTCATCAAGTATGCTTCCAGTCTTCTCAGGGGTCCCCTCGAGG
Q S P K L L I K Y A S Q S F S G V P S R - 61

TTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTACCCCTCACCATCAATAGCCTGGAAGCTGAA
F S G S G S G T D F T L T I N S L E A E - 81

GATGCTGCAGCGTATTACTGTTCATCAGAGTAGTAGTTTACCATTCACTTTCGGCCCTGGG
D A A A Y Y C H Q S S S L P F T F G P G - 101

ACCAAAGTGGATATCAAA
T K V D I K - 107
    
```

Itálicas: Secuencia líder (no en anticuerpo maduro)

Negrilla: las CDR

Construcción de vectores de expresión para cadena pesada y liviana

- 5 Se utiliza un sistema de aplicación/selección con base en GS tal como aquel descrito en EP 0256055 B, EP 0323997 B o la solicitud de patente europea 89303964, en el cual el marcador seleccionable usado es una secuencia de codificación de GS.

Ejemplo 2: Datos Bioquímicos y Biológicos

- 10 Se encontró que el anticuerpo monoclonal ACZ 885 neutraliza la actividad de la interleuquina-1β in vitro. Se caracteriza además al anticuerpo monoclonal por su enlazamiento a la IL-1β humana recombinante por medio del análisis de Biacore. La forma de neutralización se evalúa por medio de estudios de enlazamiento competitivo con receptores solubles de IL-1. Se determina la actividad biológica del anticuerpo ACZ 885 hacia la IL-1β recombinante y naturalmente producida en células humanas primarias (Ejemplo 3), sensible a la estimulación por la IL-1β.

Determinación de la constante de equilibrio de disociación

- 15 Las constantes de velocidad de asociación y disociación para el enlazamiento de la IL-1beta humana recombinante a ACZ885 se determinan por medio del análisis de BiAcCore. Se inmoviliza a ACZ885, y se mide el enlazamiento de IL-1beta recombinante en un rango de concentración de 1 a 4 nM por medio de resonancia de plasmón superficial. El formato escogido representa una interacción monovalente y de esta forma permite tratar el evento de enlazamiento de IL-1 beta a ACZ 885 de acuerdo con una estequiometría 1:1. El análisis de datos se lleva a cabo utilizando el software BIAevaluation.
- 20

	K_{activado} [10 ⁵ /Ms]	$K_{\text{desactivado}}$ [10 ⁵ /s]	K_D [pM]	
IL-1β humana	11,0 +/- 0,23	3,3 +/- 0,27	30,5 +/- 2,6	n = 22

Conclusión: ACZ885 se enlaza a la IL-1beta humana recombinante con muy alta afinidad.

Estudio de competición de enlazamiento con receptores solubles tipo I y II de la IL-1

- 25 La competición entre ACZ885 y los receptores solubles tipo I y II de la IL-1 humana se mide por medio de Biacore. Se inmoviliza ACZ885 sobre la superficie del chip y se inyecta la IL-beta humana recombinante (1 nM) para enlazamiento con ACZ885 en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes del receptor I o del receptor II solubles humanos recombinantes (0-12 nM; 4 corridas independientes cada uno). Los resultados obtenidos se dan en la Figura acompañante.

Se determinó el enlazamiento de NVP-ACZ885 a la IL-1 β humana en presencia de los receptores tipo I o tipo II solubles humanos recombinantes. Se determinaron los valores medios máximos (IC50) gráficamente utilizando el software Origin 6.0. Se obtiene el valor medio \pm SEM (n = 4).

Conclusión: El enlazamiento de ACZ885 a la IL-1 β es competitivo tanto con el receptor tipo I como con el tipo II de IL-1

5 Perfil de reactividad para la IL-1alfa humana, la IL-1RA humana, y la IL-1beta de otras especies

El perfil de reactividad de ACZ885 con IL-1alfa humana, IL-1RA humana y con la IL-1beta cinomóloga de conejo, de mürido y de ratón se determina por medio del análisis de Biacore. Se inmoviliza ACZ885, y se aplican las citoquinas examinadas en una concentración de 8 nM (6 corridas independientes).

Tabla 3: Reactividad cruzada de NVP-ACZ855 con IL-1 β , IL-1 α , e IL-1Ra

		% de Enlazamiento (media +/- SEM)
IL-1 β Humana Rec.	(n = 6)	100
IL- β Cinomóloga Rec.	(n = 11)	7,8 +/- 1,0
IL-1 β Rec. de Conejo	(n = 6)	-0,5 +/- 0,2
IL-1 β Rec. de Ratón	(n = 6)	-2,6 +/- 0,6
IL-1 β Rec. de Rata	(n = 6)	-6,2 +/- 1,0
IL-1 α Humana Rec.	(n = 6)	8,4 +/- 2,4
IL-1Ra Humana Rec.	(n = 6)	-3,7 +/- 1,7

10

Se leyeron las unidades de resonancia a los 1000 s después del inicio de la inyección; se restó una inyección del amortiguador de la corrida de todos los sensogramas, y se colocó en cero la línea base después de la inmovilización de anti-Fc γ . El enlazamiento se expresa como porcentaje de las unidades de resonancia acumuladas para la IL-1 β humana.

15 Conclusión: ACZ885 no reacciona significativamente en forma cruzada con la **IL-1alfa** humana, la IL-1Ra humana, o la **IL-1beta** cinomóloga, de conejo, de mürido o de rata.

Ejemplo 3:

Neutralización de la liberación de IL-6 de fibroblastos dérmicos humanos por medio de ACZ885

20 Se utilizó la siguiente metodología para evaluar la actividad biológica de ACZ885 en la neutralización de la acción de la IL-1 β humana:

1. Preparación de medio acondicionado que contiene la IL-1 β

25 La preparación de medio acondicionado a partir de células mononucleares humanas de sangre periférica se hizo de la siguiente manera: se prepararon células mononucleares a partir de la sangre periférica de monos utilizando el método de separación por densidad de Ficoll-Hypaque de acuerdo con el método de Hansel [Hansel, T. T. y colaboradores (1991). An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. J. Imm. Methods. 145: 105-110]; ellas fueron utilizadas en una concentración de 10⁵ células/pozo en RPMI/FCS al 10%. Se añadieron IFN β (100 U/ml) y LPS (5 μ g/ml) y se incubaron posteriormente las células durante 6 horas. Se terminó la incubación por medio de centrifugación a 1200 RPM durante 10 min. Se cuantificó la IL-1 β en el sobrenadante utilizando un ELISA

30 2. Ensayo de neutralización

Se adquirieron fibroblastos de prepucio dérmico humano a Clonetics (CC-2509) y se los cultivó en FBM (Clonetics, CC-3131) incluyendo bFGF (1 ng/ml, CC-4065), insulina (5 β g/ml, CC-4021), y FCS al 2% (CC-4101).

5 Para la inducción de IL-6, se cultivaron células con una densidad de 10^4 células por pozo en un racimo de tejido de 48 pozos. Al día siguiente, se hizo pasar hambre a las células durante 6-7 h en FBM que contenía FCS al 2% antes de la adición de citoquina. Para estimulación, se reemplazó el medio de cultivo por FBM + FCS al 2% que contenía la cantidad apropiada de medio acondicionado aproximadamente por 50 μ g/ml de la IL-1 β . Alternativamente, se utilizó la IL-1 β humana recombinante con una concentración final de 50 μ g/ml.

Se tituló hasta neutralización el anticuerpo anti-IL 1 β dentro del medio acondicionado diluido antes de la adición a las células. Se utilizó la IL-1Ra recombinante (R&D Systems # 280-RA-010) como control positivo.

10 Se recogió el sobrenadante celular 16-17 h después de la estimulación y se determinó la cantidad de la IL-6 liberada en un ELISA tipo sándwich.

3. ELISA de la IL-6

15 Se recubrieron las placas de microtitulación para ELISA con un MAb de la IL-6 anti-humana de múmero (314-14 (Novartis Pharma; lote EN23.961, 5,5 mg/mn; 100 μ l con una concentración de 3 μ g/ml) en NaN₃ al 0,02% en PBS y se incubó durante la noche a +4 °C. Al día siguiente, se lavaron las placas de microtitulación 4 veces con PBS/Tween al 0,05%/NaN₃ al 0,02% y se bloqueó con 300 μ l de PBS/albumina de suero bovino al 3% (BSA)/ NaN₃ al 0,02% durante 3 h. Se lavaron las placas nuevamente (4 veces) y se añadieron 100 μ l de sobrenadante (diluciones finales de 1:20) o de la IL-6 humana recombinante estándar ((Novartis Pharma #91902), curva de titulación en el rango entre 1 hasta 0,0156 ng/ml en etapas de dilución de 2 veces) por duplicado. Después de una noche de incubación a RT, se lavaron las placas (4 veces) y se añadió un MAb diferente de la IL-6 antihumana de múmero (110-14, Novartis Pharma; 6,3 mg/ml); 100 μ l con una concentración de 1 μ g/ml; 3 h a temperatura ambiente). Después de 4 lavados adicionales, se añadió un antisuero de IgG2b antiratón de cabra marcado con biotina (Southern Biotechnology; #1090-08) a la dilución final de 1/10000 (100 μ l/pozo; 3 h a temperatura ambiente). Después de la incubación se lavaron las placas 4 veces y se añadió estreptavidina acoplada a fosfatasa alcalina (Jackson Immunoresearch, #016-050-084) hasta una dilución final de 1/3000 (100 μ l/pozo; 30 min a temperatura ambiente). Después del lavado (4 veces) se añadió el sustrato (p-nitrofenilfosfato en amortiguador de dietanolamina; 100 μ l) durante 30 min. La reacción fue bloqueada por medio de la adición de 50 μ l/pozo de NaOH 1,5 M. Se leyeron las placas en un lector de microtitulación (Bio-Rad) utilizando filtros de 405 y 490 nm.

30 Los niveles de IL-6 en los sobrenadantes del cultivo fueron calculados en referencia con la curva estándar utilizando el ajuste cúbico de la curva. La evaluación estadística y la determinación de IC50 se realizó con base en el ajuste sigmoidal de la curva.

Resultados:

Tabla: Inhibición de la secreción de IL-6 inducida por IL-1 β

	Lote 1 de NVP-ACZ885	Lote 2 de NVP-ACZ885	IL-1ra
	IC ₅₀ [pM] \pm SEM	IC ₅₀ [pM] \pm SEM	IC ₅₀ [pM] \pm SEM
Secreción de IL-6 medio acondicionado	54 \pm 6,1 (9,1 \pm 1,0 ng/ml) (n = 6)	44,6 \pm 3,6 (7,4 \pm 0,6 ng/ml) (n = 6)	30 \pm 3,1 (0,51 \pm 0,05 ng/ml) (n = 5)
Secreción de IL-6 IL-1 β humana rec.	42 \pm 3,4 (7,1 \pm 0,56 ng/ml) (n = 4)	63 \pm 2,8 (10,5 \pm 0,5 ng/ml) (n = 6)	nd

Los valores de IC_{50} para inhibición de la secreción inducida de IL-1 β de IL-6 a partir de fibroblastos dérmicos humanos. Los fibroblastos fueron estimulados con la IL-1 β humana recombinante o medio acondicionado que contiene entre 50 y 100 μ g/ml de IL-1 β .

Ejemplo 4:

5 Definición del epítipo para ACZ885

10 ACZ885 se enlaza a IL-1 β humana con gran afinidad, pero falla en reconocer la gran homología de la IL-1 β derivada de monos Rhesus. Una de las diferencias más prominentes en las secuencias de aminoácidos entre IL-1 β de Rhesus y humana está en la posición 64 de la IL-1 β madura. La IL-1 β humana tiene un ácido glutámico, y Rhesus una alanina en esta posición. Una IL-1 β humana mutante con el respectivo reemplazo de Glu64 por Ala ha perdido su habilidad para enlazarse a ACZ885 con afinidad medible. Concluimos que Glu64 en IL-1 β humana es esencial para el reconocimiento por parte del anticuerpo ACZ885. Glu64 se localiza sobre un bucle de IL-1 β que no hace parte de la superficie de enlazamiento al receptor tipo I de la IL-1 β , o muy cerca a él. Por lo tanto, los anticuerpos dirigidos contra un epítipo de enlazamiento que incorpora Glu64 tienen el potencial para neutralizar la actividad biológica de la IL-1 β humana.

15

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de enlazamiento a la IL-1 β que comprende tanto a los dominios variables de cadena liviana (V_L) como de cadena pesada (V_H) en los cuales dicha molécula de enlazamiento a la IL-1 β contiene al menos un sitio de enlazamiento del antígeno que comprende:
- 5 a) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que comprende a las regiones hipervariables en secuencia CDR1, CDR2 y CDR3, dicha CDR1 teniendo la secuencia de aminoácidos Val-Tyr-Gly-Met-Asn, dicha CDR2 teniendo la secuencia de aminoácidos Ile-Ile-Trp-Tyr-Asp-Gly-Asp-Asn-Gln-Tyr-Tyr-Ala-Asp-Ser-Val-Lys-Gly, y dicha CDR3 teniendo la secuencia de aminoácidos Asp-Leu-Arg-Thr-Gly-Pro; y
- 10 b) un dominio variable de cadena liviana de inmunoglobulina (V_L) que comprende a las regiones hipervariables en secuencia CDR1', CDR2' y CDR3', dicha CDR1' teniendo la secuencia de aminoácidos Arg-Ala-Ser-Gln-Ser-Ile-Gly-Ser-Ser-Leu-His dicha CDR2' teniendo la secuencia de aminoácidos Ala-Ser-Gln-Ser-Phe-Ser y dicha CDR3' teniendo la secuencia de aminoácidos His-Gln-Ser-Ser-Ser-Leu-Pro;
- y los equivalentes directos de los mismos en los cuales las regiones hipervariables CDR1, CDR2, CDR3, CDR1', CDR2' y CDR3' tomadas como un todo son al menos 95% homólogas a las regiones hipervariables bajo a) y b),
- 15 y tienen una especificidad de enlazamiento por el epítipo antigénico de la IL-1 β que incluye al bucle que incluye al residuo Glu 64 de la IL-1 β de 50 pM o menos.
2. Una molécula de enlazamiento a la IL-1 β de acuerdo con la reivindicación 1 que es un anticuerpo humano.
3. Una molécula de enlazamiento a la IL-1 β que contiene al menos un sitio de enlazamiento para el antígeno que comprende un primer dominio que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a aquella mostrada en la Seq. Id. No. 1 que inicia con el aminoácido en posición 1 y termina con el aminoácido en posición 118 y un segundo dominio que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a aquella mostrada en la Seq. Id. No. 2, que inicia con el aminoácido en posición 1 y termina con el aminoácido en posición 107.
- 20 4. Un vector de expresión que incluye ya sea un vector de expresión único o un juego de dos vectores de expresión compatibles, que comprenden:
- 25 1) una primera construcción de ADN que codifica una cadena pesada o fragmento de la misma y comprende:
- a) una primera parte que codifica a un dominio variable que comprende alternativamente regiones marco e hipervariables, estando dichas regiones hipervariables en secuencia CDR1, CDR2 y CDR3 cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en la Seq. Id. No. 1; comenzando esta primera parte con un codón que codifica al primer aminoácido del dominio variable y terminando con un codón que codifica al último aminoácido del dominio variable, y
- 30 b) una segunda parte que codifica a una parte constante de cadena pesada o fragmento de la misma que comienza con un codón que codifica al primer aminoácido de la parte constante de la cadena pesada y termina con un codón que codifica al último aminoácido de la parte constante o fragmento del mismo, seguido por un codón de detención, y
- 2) una segunda construcción de ADN que codifica una cadena liviana o fragmento de la misma y comprende:
- a) una primera parte que codifica a un dominio variable que comprende alternativamente regiones marco e hipervariables, estando dichas regiones hipervariables en secuencia CDR1', y CDR3', cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en la Seq. Id. No. 2; esta primera parte comenzando con un codón que codifica al primer aminoácido del dominio variable y terminando con un codón que codifica al último aminoácido del dominio variable, y
- 35 b) una segunda parte que codifica a una parte constante de cadena liviana o fragmento de la misma que comienza con un codón que codifica al primer aminoácido de la parte constante de la cadena liviana y termina con un codón que codifica al último aminoácido de la parte constante o fragmento del mismo, seguido por un codón de detención.
- 40 5. Un vector de expresión de acuerdo a la reivindicación 4 que es capaz de replicar en una línea celular procariota o eucariota.
6. Un proceso para la producción de una molécula de enlazamiento a la IL-1 β que comprende (i) cultivar un organismo que es transformado con un vector de expresión de acuerdo a la reivindicación 5 y (ii) recuperar la molécula de enlazamiento a la IL-1 β del cultivo.
- 45

7. El uso de un anticuerpo contra la IL-1 β de acuerdo con la reivindicación 2, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediados por la IL-1 β .
8. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo contra la IL-1 β de acuerdo con la reivindicación 2, en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable, diluyente o portador.

5

Figura

