

ESCOBAR - URIBE ASOCIADOS

A B O G A D O S

Carrera 11A No. 94-76 Of. 305 - P.O. Box 94948, Bogotá, Colombia, S.A.

Tels.: (571) 6162051 - 6162061 - 6161850 - 6161869

Fax: (571) 6161889

2422/P

COPIA CERTIFICADA
Radicación: 01-003.434
Fecha (G.O.): 2001-03-21 13:22:29
Trasite : 0.2 FIRMES 0 : REGISTRAR 2.9 CORREO E.
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. 01-003.434
Solicitud de Patente en nombre de
NOVARTIS AG

Yo, JIMENA ESCOBAR URIBE, identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en Bogotá, en la Carrera 11 A No. 94-76 Of. 305, obrando como apoderada de la sociedad NOVARTIS AG., solicitante de la patente de la referencia, anexo al presente memorial los siguientes documentos:

Copia certificada de la solicitud de Patente Número 0001448.0 presentada en Gran Bretaña el día 21 de enero del 2000, respectivamente, con la debida traducción de lo pertinente, incluyendo el capítulo reivindicatorio.

A este mismo respecto, debe tenerse en cuenta que en la segunda página de la copia en mención la Oficina de Patentes correspondiente certificó la fecha de presentación de esa solicitud, cumpliéndose de esta forma todos y cada uno de los requisitos establecidos en el inciso segundo del artículo 10 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

Señor Superintendente,


JIMENA ESCOBAR URIBE
C.C.39.779.452 de usaquén
T.P. 68.228
Cod. 5376



2422. 7/1
68
INVENTOR IN PEOPLE

The Patent Office
Concept House
Cardiff Road
Newport
South Wales
NP10 8QQ

I, the undersigned, being an officer duly authorised in accordance with Section 74(1) and (4) of the Deregulation & Contracting Out Act 1994, to sign and issue certificates on behalf of the Comptroller-General, hereby certify that annexed hereto is a true copy of the documents as originally filed in connection with the patent application identified therein.

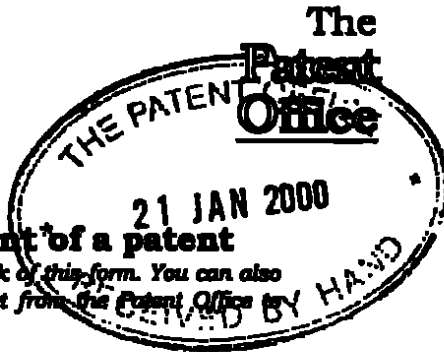
In accordance with the Patents (Companies Re-registration) Rules 1982, if a company named in this certificate and any accompanying documents has re-registered under the Companies Act 1980 with the same name as that with which it was registered immediately before re-registration save for the substitution as, or inclusion as, the last part of the name of the words "public limited company" or their equivalents in Welsh, references to the name of the company in this certificate and any accompanying documents shall be treated as references to the name with which it is so re-registered.

In accordance with the rules, the words "public limited company" may be replaced by p.l.c., plc, P.L.C. or PLC.

Re-registration under the Companies Act does not constitute a new legal entity but merely subjects the company to certain additional company law rules.

Signed

Dated 15 November 2000



1/77

69

Request for grant of a patent

(See the notes on the back of this form. You can also get an explanatory leaflet from the Patent Office to help you fill in this form)

The Patent Office
Cardiff Road
Newport
Gwent NP9 1RH

1. Your reference	4-31289P1	24 JAN 00 E507293-1 D00524 P01/7700 0.00-0001448.0
2. Patent application number (The Patent Office will fill in this part)	0001448.0	
3. Full name, address and postcode of the or of each applicant (underline all surnames)	NOVARTIS AG SCHWARZWALDALLEE 215 4058 BASEL SWITZERLAND	
Patent ADP number (if you know it)	7125487002	
If the applicant is a corporate body, give the country/state of its incorporation	SWITZERLAND	
4. Title of invention	ORGANIC COMPOUNDS	
5. Name of your agent (if you have one)	B.A. YORKE & CO. CHARTERED PATENT AGENTS COOMB HOUSE, 7 ST. JOHN'S ROAD ISLEWORTH MIDDLESEX TW7 6NH	
"Address for service" in the United Kingdom to which all correspondence should be sent (including the postcode)		
Patents ADP number (if you know it)	1800001	
6. If you are declaring priority from one ore more earlier patent applications, give the country and the date of filing of the or of each of these earlier applications and (if you know it) the or each application number	Country	Priority application number (if you know it)
		Date of filing (day/month/year)
7. If this application is divided or otherwise derived from an earlier UK application, give the number and the filing date of the earlier application	Number of earlier application	Date of filing (day/month/year)
8. Is a statement of inventorship and of right to grant of a patent required in support of this request? (Answer 'Yes' if:	Yes	
a) any applicant named in part 3 is not an inventor, or		
b) there is an inventor who is not named as an applicant, or		
c) any named applicant is a corporate body.		
(see note (d))		

Patents Form 1/77

9. Enter the number of sheets for any of the following items you are filing with this form. Do not count copies of the same document

Continuation sheets of this form

Description 25

Claim(s) 3

Abstract

Drawing(s) 3

10. If you are also filing any of the following, state how many against each item.

Priority documents

Translations of priority documents

Statement of inventorship and right to grant of a patent (*Patents Form 7/77*)

Request for preliminary examination and search (*Patents Form 9/77*) ONE

Request for substantive examination (*Patents Form 10/77*)

Any other documents (please specify)

11. I/We request the grant of a patent on the basis of this application

Signature

Date

B.A. Yorke & Co.

B.A. Yorke & Co.

21.01.00

12. Name and daytime telephone number of person to contact in the United Kingdom Mrs. E. Cheetham
020 8560 5847

Warning

After an application for a patent has been filed, the Comptroller of the Patent Office will consider whether publication or communication of the invention should be prohibited or restricted under Section 22 of the Patents Act 1977. You will be informed if it is necessary to prohibit or restrict your invention in this way. Furthermore, if you live in the United Kingdom, Section 23 of the Patents Act 1977 stops you from applying for a patent abroad without first getting written permission from the Patent Office unless an application has been filed at least 6 weeks beforehand in the United Kingdom for a patent for the same invention and either no direction prohibiting publication or communication has been given, or any such direction has been revoked.

Notes

- If you need help to fill in this form or you have any questions, please contact the Patent Office on 0645 500505.
- Write your answers in capital letters using black ink or you may type them.
- If there is not enough space for all the relevant details on any part of this form, please continue on a separate sheet of paper and write "see continuation sheet" in the relevant part(s). Any continuation sheet should be attached to this form.
- Once you have filled in the form you must remember to sign and date it.
- For details of the fee and ways to pay please contact the Patent Office.

Patents Form 1/77

ORGANIC COMPOUNDS

This invention relates to antibodies to human interleukin I beta (IL-1 β) and to the use of such antibodies for the treatment of IL-1 mediated diseases and disorders.

Interleukin 1 (IL-1) is an activity produced by cells of the immune system which acts as a mediator of the acute phase inflammatory response. Inappropriate or excessive production of IL-1, in particular IL-1 β , is associated with the pathology of various diseases and disorders, such as septicemia, septic or endotoxic shock, allergies, asthma, bone loss, ischemia, stroke, rheumatoid arthritis and other inflammatory disorders. Antibodies to IL-1 β have been proposed for use in the treatment of IL-1 mediated diseases and disorders; see for instance, WO 95/01997 and the discussion in the introduction thereof.

We have now prepared improved antibodies to human IL-1 β for use in the treatment of IL-1 mediated diseases and disorders.

Accordingly the invention provides an IL-1 β binding molecule which comprises an antigen binding site comprising at least one immunoglobulin heavy chain variable domain (V_H) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1, CDR2 and CDR3, said CDR1 having the amino acid sequence Ser-Tyr-Trp-Ile-Gly, said CDR2 having the amino acid sequence Ile-Ile-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ser-Asp-Thr-Arg-Tyr-Ser-Pro-Ser-Phe-Gln-Gly, and said CDR3 having the amino acid sequence Tyr-Thr-Asn-Trp-Asp-Ala-Phe-Asp-Ile; and direct equivalents thereof.

In a first aspect the invention provides a single domain IL-1 β binding molecule comprising an isolated immunoglobulin heavy chain comprising a heavy chain variable domain (V_H) as defined above.

In a second aspect the invention also provides an IL-1 β binding molecule comprising both heavy (V_H) and light chain (V_L) variable domains in which said IL-1 β binding molecule comprises at least one antigen binding site comprising:

- a) an immunoglobulin heavy chain variable domain (V_H) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1, CDR2 and CDR3, said CDR1 having the amino acid sequence Ser-Tyr-Trp-Ile-Gly, said CDR2 having the amino acid sequence Ile-Ile-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ser-Asp-Thr-Arg-Tyr-Ser-Pro-Ser-Phe-Gln-Gly, and said CDR3 having the amino acid sequence Tyr-Thr-Asn-Trp-Asp-Ala-Phe-Asp-Ile, and
- b) an immunoglobulin light chain variable domain (V_L) which comprises a CDR3' hypervariable region having the amino acid sequence Gln-Gln-Arg-Ser-Asn-Trp-Met-Phe-Pro;

and direct equivalents thereof.

In particular embodiments of the second aspect the invention provides an IL-1 β binding molecule comprising both heavy (V_H) and light (V_L) chain variable domains in which said IL-1 β binding molecule comprises at least one antigen binding site comprising:

- a) an immunoglobulin heavy chain variable domain (V_H) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1, CDR2 and CDR3, said CDR1 having the amino acid sequence Ser-Tyr-Trp-Ile-Gly, said CDR2 having the amino acid sequence Ile-Ile-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ser-Asp-Thr-Arg-Tyr-Ser-Pro-Ser-Phe-Gln-Gly, and said CDR3 having the amino acid sequence Tyr-Thr-Asn-Trp-Asp-Ala-Phe-Asp-Ile, and
- b) an immunoglobulin light chain variable domain (V_L) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1', CDR2' and CDR3', said CDR1' having the amino acid sequence Arg-Ala-Ser-Gln-Ser-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu Ala, said CDR2' having the amino acid sequence Asp-Ala-Ser-Asn-Arg-Ala-Thr, and said CDR3' having the amino acid sequence Gln-Gln-Arg-Ser-Asn-Trp-Met-Phe-Pro;

and direct equivalents thereof.

Unless otherwise indicated, any polypeptide chain is herein described as having an amino acid sequence starting at the N-terminal extremity and ending at the C-terminal extremity. When the antigen binding site comprises both the V_H and V_L domains, these may be located on the same polypeptide molecule or, preferably, each domain may be on a different chain, the V_H domain being part of an immunoglobulin heavy chain or fragment thereof and the V_L being part of an immunoglobulin light chain or fragment thereof.

21
71

By "IL-1 β binding molecule" is meant any molecule capable of binding to the IL-1 β antigen either alone or associated with other molecules. The binding reaction may be shown by standard methods (qualitative assays) including, for example, a bioassay for determining the inhibition of IL-1 β binding to its receptor or any kind of binding assays, with reference to a negative control test in which an antibody of unrelated specificity but of the same isotype, e.g. an anti-CD25 antibody, is used. Advantageously, the binding of the IL-1 β binding molecules of the invention to IL-1 β may be shown in a competitive binding assay.

Examples of antigen binding molecules include antibodies as produced by B-cells or hybridomas and chimeric, CDR-grafted or human antibodies or any fragment thereof, e.g. F(ab')₂ and Fab fragments, as well as single chain or single domain antibodies.

A single chain antibody consists of the variable domains of the heavy and light chains of an antibody covalently bound by a peptide linker usually consisting of from 10 to 30 amino acids, preferably from 15 to 25 amino acids. Therefore, such a structure does not include the constant part of the heavy and light chains and it is believed that the small peptide spacer should be less antigenic than a whole constant part. By "chimeric antibody" is meant an antibody in which the constant regions of heavy or light chains or both are of human origin while the variable domains of both heavy and light chains are of non-human (e.g. murine) origin or of human origin but derived from a different human antibody. By "CDR-grafted antibody" is meant an antibody in which the hypervariable regions (CDRs) are derived from a donor antibody, such as a non-human (e.g. murine) antibody or a different human antibody, while all or substantially all the other parts of the immunoglobulin e.g. the constant regions and the highly conserved parts of the variable domains, i.e. the framework regions, are derived from an acceptor antibody, e.g. an antibody of human origin. A CDR-grafted antibody may however contain a few amino acids of the donor sequence in the framework regions, for instance in the parts of the framework regions adjacent to the hypervariable regions. By "human antibody" is meant an antibody in which the constant and variable regions of both the heavy and light chains are all of human origin, or substantially identical to sequences of human origin, not necessarily from the same antibody and includes antibodies produced by mice in which the murine immunoglobulin variable and constant part genes have been replaced by their human counterparts, e.g. as described in general terms in EP

0546073 B1, USP 5545806, USP 5569825, USP 5625126, USP 5633425, USP 5661016, USP 5770429, EP 0 438474 B1 and EP 0 463151 B1.

Particularly preferred IL-1 β binding molecules of the invention are human antibodies especially the AAL 160 antibody as hereinafter described in the Examples.

Thus in preferred chimeric antibodies the variable domains of both heavy and light chains are of human origin, for instance those of the AAL 160 antibody which are shown in Seq. Id. No. 1 and Seq. Id. No. 2. The constant region domains preferably also comprise suitable human constant region domains, for instance as described in "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat E.A. et al, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health

Hypervariable regions may be associated with any kind of framework regions, though preferably are of human origin. Suitable framework regions are described in Kabat E.A. et al, ibid. The preferred heavy chain framework is a human heavy chain framework, for instance that of the AAL 160 antibody which is shown in Seq. Id. No. 1. It consists in sequence of FR1, FR2, FR3 and FR4 regions. In a similar manner, Seq. Id. No. 2 shows the preferred AAL 160 light chain framework which consists, in sequence, of FR1', FR2', FR3' and FR4' regions.

Accordingly, the invention also provides an IL-1 β binding molecule which comprises at least one antigen binding site comprising either a first domain having an amino acid sequence substantially identical to that shown in Seq. Id. No. 1 starting with amino acid at position 1 and ending with amino acid at position 118 or a first domain as described above and a second domain having an amino acid sequence substantially identical to that shown in Seq. Id. No. 2, starting with amino acid at position 1 and ending with amino acid at position 107.

Monoclonal antibodies raised against a protein naturally found in all humans are typically developed in a non-human system e.g. in mice. As a direct consequence of this, a xenogenic antibody as produced by a hybridoma, when administered to humans, elicits an undesirable immune response which is predominantly mediated by the constant part of the xenogenic immunoglobulin. This clearly limits the use of such antibodies as they cannot be administered over a prolonged period of time. Therefore it is particularly preferred to use single chain, single

25
72

domain, chimeric, CDR-grafted, or especially human antibodies which are not likely to elicit a substantial allogenic response when administered to humans.

In view of the foregoing, a more preferred IL-1 β binding molecule of the invention is selected from a human anti IL-1 β antibody which comprises at least

- a) an immunoglobulin heavy chain or fragment thereof which comprises (i) a variable domain comprising in sequence the hypervariable regions CDR1, CDR2 and CDR3 and (ii) the constant part or fragment thereof of a human heavy chain; said CDR1 having the amino acid sequence Ser-Tyr-Trp-Ile-Gly, said CDR2 having the amino acid sequence Ile-Ile-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ser-Asp-Thr-Arg-Tyr-Ser-Pro-Ser-Phe-Gln-Gly, and said CDR3 having the amino acid sequence Tyr-Thr-Asn-Trp-Asp-Ala-Phe-Asp-Ile and
 - b) an immunoglobulin light chain or fragment thereof which comprises (i) a variable domain comprising the CDR3' hypervariable region and optionally also the CDR1', CDR2' hypervariable regions and (ii) the constant part or fragment thereof of a human light chain, said CDR1' having the amino acid sequence Arg-Ala-Ser-Gln-Ser-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu Ala, said CDR2' having the amino acid sequence Asp-Ala-Ser-Asn-Arg-Ala-Thr, and said CDR3' having the amino acid sequence Gln-Gln-Arg-Ser-Asn-Trp-Met-Phe-Pro;
- and direct equivalents thereof.

Alternatively, an IL-1 β binding molecule of the invention may be selected from a single chain binding molecule which comprises an antigen binding site comprising

- a) a first domain comprising in sequence the hypervariable regions CDR1, CDR2 and CDR3, said hypervariable regions having the amino acid sequences as shown in Seq. Id. No. 1,
 - b) A second domain comprising the hypervariable regions CDR3' and optionally CDR1' and CDR2', said hypervariable regions having the amino acid sequences as shown in Seq. Id. No. 2 and
 - c) a peptide linker which is bound either to the N-terminal extremity of the first domain and to the C-terminal extremity of the second domain or to the C-terminal extremity of the first domain and to the N-terminal extremity of second domain;
- and direct equivalents thereof.

As it is well known, minor changes in an amino acid sequence such as deletion, addition or substitution of one, a few or even several amino acids may lead to an allelic form of the original protein which has substantially identical properties.

Thus, by the term "direct equivalents thereof" is meant either any single domain IL-1 β binding molecule (molecule X).

- (i) in which the hypervariable regions CDR1, CDR2 and CDR3 taken as a whole are at least 80% homologous, preferably at least 90% homologous, more preferably at least 95% homologous to the hypervariable regions as shown in Seq. Id. No. 1 and,
- (ii) which is capable of inhibiting the binding of IL-1 β to its receptor substantially to the same extent as a reference molecule having framework regions identical to those of molecule X but having hypervariable regions CDR1, CDR2 and CDR3 identical to those shown in Seq. Id. No. 1

or any IL-1 β binding molecule having at least two domains per binding site (molecule X')

- (i) in which the hypervariable regions CDR1, CDR2, CDR3, CDR3' and optionally CDR1' and CDR2' taken as a whole are at least 80% homologous, preferably at least 90% homologous, more preferably at least 95% homologous, to the hypervariable regions as shown in Seq. Id. No. 1 and 2 and
- (ii) which is capable of inhibiting the binding of IL-1 β to its receptor substantially to the same extent as a reference molecule having framework regions and constant parts identical to molecule X', but having hypervariable regions CDR1, CDR2, CDR3, and CDR3', and optionally CDR1' and CDR2', identical to those shown in Seq. Id. No. 1 and 2.

In the present description amino acid sequences are at least 80% homologous to one another if they have at least 80% identical amino acid residues in a like position when the sequence are aligned optimally, gaps or insertions in the amino acid sequences being counted as non-identical residues.

The inhibition of the binding of IL-1 β to its receptor may be conveniently tested in various assays including such assays are described hereinafter in the text. By the term "to the same extent" is meant that the reference and the equivalent molecules exhibit, on a statistical basis, essentially identical IL-1 β binding inhibition curves in one of the assays referred to above.

For example, the assay used may be an assay of competitive inhibition of binding of IL-1 β by soluble IL-1 receptors and the IL-1 β binding molecules of the invention.

Most preferably, the human IL-1 β antibody comprises at least

- a) one heavy chain which comprises a variable domain having an amino acid sequence substantially identical to that shown in Seq. Id. No. 1 starting with the amino acid at position 1 and ending with the amino acid at position 118 and the constant part of a human heavy chain; and
- b) one light chain which comprises a variable domain having an amino acid sequence substantially identical to that shown in Seq. Id. No. 2 starting with the amino acid at position 1 and ending with the amino acid at position 107 and the constant part of a human light chain.

The constant part of a human heavy chain may be of the γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , μ , α_1 , α_2 , δ or ϵ type, preferably of the γ type, more preferably of the γ_1 type, whereas the constant part of a human light chain may be of the κ or λ type (which includes the λ_1 , λ_2 and λ_3 subtypes) but is preferably of the κ type. The amino acid sequences of all these constant parts are given in Kabat et al *ibid*.

An IL-1 β binding molecule of the invention may be produced by recombinant DNA techniques. In view of this, one or more DNA molecules encoding the binding molecule must be constructed, placed under appropriate control sequences and transferred into a suitable host organism for expression.

In a very general manner, there are accordingly provided

- (i) DNA molecules encoding a single domain IL-1 β binding molecule, of the invention, a single chain IL-1 β binding molecule of the invention, a heavy or light chain or fragments thereof of a IL-1 β binding molecule of the invention and
- (ii) the use of the DNA molecules of the invention for the production of a IL-1 β binding molecule of the invention by recombinant means.

The present state of the art is such that the skilled worker in the art is able to synthesize the DNA molecules of the invention given the information provided herein i.e. the amino acid sequences of the hypervariable regions and the DNA sequences coding for them. A method for constructing a variable domain gene is for example described in EPA 239 400 and may be briefly summarized as follows: A gene encoding a variable domain of a MAb of whatever specificity is cloned. The DNA segments encoding the framework and hypervariable regions are determined and the DNA segments encoding the hypervariable regions are removed so that the DNA segments encoding the framework regions are fused together with suitable restriction sites at the junctions. The restriction sites may be generated at the appropriate positions by mutagenesis of the DNA molecule by standard procedures. Double stranded synthetic CDR cassettes are prepared by DNA synthesis according to the sequences given in Seq. Id. No. 1 or 2. These cassettes are provided with sticky ends so that they can be ligated at the junctions of the framework

Furthermore, it is not necessary to have access to the mRNA from a producing hybridoma cell line in order to obtain a DNA construct coding for the IL-1 β binding molecules of the invention. Thus PCT application WO 90/07861 gives full instructions for the production of an antibody by recombinant DNA techniques given only written information as to the nucleotide sequence of the gene. The method comprises the synthesis of a number of oligonucleotides, their amplification by the PCR method, and their splicing to give the desired DNA sequence.

Expression vectors comprising a suitable promoter or genes encoding heavy and light chain constant parts are publicly available. Thus, once a DNA molecule of the invention is prepared it may be conveniently transferred in an appropriate expression vector. DNA molecules encoding single chain antibodies may also be prepared by standard methods, for example, as described in WO 88/1649.

~~22~~
74

In view of the foregoing no hybridoma or cell line deposit is necessary to comply with the criteria of sufficiency of description.

In a particular embodiment the invention includes first and second DNA constructs for the production of an IL-1 β binding molecule as described below:

The first DNA construct encodes a heavy chain or fragment thereof and comprises

- a) a first part which encodes a variable domain comprising alternatively framework and hypervariable regions, said hypervariable regions being in sequence CDR1, CDR2 and CDR3 the amino acid sequences of which are shown in Seq. Id. No. 1; this first part starting with a codon encoding the first amino acid of the variable domain and ending with a codon encoding the last amino acid of the variable domain, and
- b) a second part encoding a heavy chain constant part or fragment thereof which starts with a codon encoding the first amino acid of the constant part of the heavy chain and ends with a codon encoding the last amino acid of the constant part or fragment thereof, followed by a stop codon.

Preferably, this first part encodes a variable domain having an amino acid sequence substantially identical to the amino acid sequence as shown in Seq. Id. No. 1 starting with the amino acid at position 1 and ending with the amino acid at position 118. More preferably the first part has the nucleotide sequence as shown in Seq. Id. No. 1 starting with the nucleotide at position 1 and ending with the nucleotide at position 354. Also preferably, the second part encodes the constant part of a human heavy chain, more preferably the constant part of the human γ 1 chain. This second part may be a DNA fragment of genomic origin (comprising introns) or a cDNA fragment (without introns).

The second DNA construct encodes a light chain or fragment thereof and comprises

- a) a first part which encodes a variable domain comprising alternatively framework and hypervariable regions; said hypervariable regions being CDR3' and optionally CDR1' and CDR2', the amino acid sequences of which are shown in Seq. Id. No. 2; this first part

starting with a codon encoding the first amino acid of the variable domain and ending with a codon encoding the last amino acid of the variable domain, and

- b) a second part encoding a light chain constant part or fragment thereof which starts with a codon encoding the first amino acid of the constant part of the light chain and ends with a codon encoding the last amino acid of the constant part or fragment thereof followed by a stop codon.

Preferably, this first part encodes a variable domain having an amino acid sequence substantially identical to the amino acid sequence as shown in Seq. Id. No. 2 starting with the amino acid at position 1 and ending with the amino acid at position 107. More preferably, the first part has the nucleotide sequence as shown in Seq. Id. No. 2 starting with the nucleotide at position 1 and ending with the nucleotide at position 321. Also preferably the second part encodes the constant part of a human light chain, more preferably the constant part of the human κ chain.

The invention also includes IL-1 β binding molecules in which one or more of the residues of CDR1, CDR2, CDR3, CDR1', CDR2' or CDR3' are changed from the residues shown in Seq. Id. No. 1 and Seq. Id. No. 2; for instance by mutation e.g. site directed mutagenesis of the corresponding DNA sequences. The invention includes the DNA sequences coding for such changed IL-1 β binding molecules. In particular the invention includes IL-1 β binding molecules in which one or more residues of CDR1' or CDR2' have been changed from the residues shown in Seq. Id. No. 2.

In the first and second DNA constructs, the first and second parts may be separated by an intron, and, an enhancer may be conveniently located in the intron between the first and second parts. The presence of such an enhancer which is transcribed but not translated, may assist in efficient transcription. In particular embodiments the first and second DNA constructs comprise the enhancer of a heavy chain gene advantageously of human origin.

Each of the DNA constructs are placed under the control of suitable control sequences, in particular under the control of a suitable promoter. Any kind of promoter may be used, provided that it is adapted to the host organism in which the DNA constructs will be transferred for

expression. However, if expression is to take place in a mammalian cell, it is particularly preferred to use the promoter of an immunoglobulin gene.

The desired antibody may be produced in a cell culture or in a transgenic animal. A suitable transgenic animal may be obtained according to standard methods which include micro injecting into eggs the first and second DNA constructs placed under suitable control sequences transferring the so prepared eggs into appropriate pseudo-pregnant females and selecting a descendant expressing the desired antibody.

When the antibody chains are produced in a cell culture, the DNA constructs must first be inserted into either a single expression vector or into two separate but compatible expression vectors, the latter possibility being preferred.

Accordingly, the invention also provides an expression vector able to replicate in a prokaryotic or eukaryotic cell line which comprises at least one of the DNA constructs above described.

Each expression vector containing a DNA construct is then transferred into a suitable host organism. When the DNA constructs are separately inserted on two expression vectors, they may be transferred separately, i.e. one type of vector per cell, or co-transferred, this latter possibility being preferred. A suitable host organism may be a bacterium, a yeast or a mammalian cell line, this latter being preferred. More preferably, the mammalian cell line is of lymphoid origin, e.g. a myeloma, hybridoma or a normal immortalised B-cell, which conveniently does not express any endogenous antibody heavy or light chain.

For expression in mammalian cells it is preferred that the IL-1 β binding molecule coding sequence is integrated into the host cell DNA within a locus which permits or favours high level expression of the IL-1 β binding molecule. Cells in which the IL-1 β binding molecule coding sequence is integrated into such favourable loci may be identified and selected on the basis of the levels of the IL-1 β binding molecule which they express. Any suitable selectable marker may be used for preparation of host cells containing the IL-1 β binding molecule coding sequence; for instance, a dhfr gene/methotrexate or equivalent selection system may be used. Preferred systems

for expression of the IL-1 β binding molecules of the invention include GS-based amplification/selection systems, such as those described in EP 0256055 B, EP 0323997 B and European patent application 89303964.4.

In a further aspect of the invention there is provided a process for the product of an IL-1 β binding molecule which comprises (i) culturing an organism which is transformed with an expression vector as defined above and (ii) recovering the IL-1 β binding molecule from the culture.

In accordance with the present invention it has been found that the AAL160 antibody has binding specificity for the antigenic epitope of human IL-1 β which includes the loop comprising residues, Gly 22, Pro 23, Tyr 24 and Glu 25 of mature human IL-1 β . (Residues, Gly 22, Pro 23, Tyr 24 and Glu 25 of mature human IL-1 β correspond to residues 138, 139, 140 and 141 respectively of the human IL-1 β precursor.) This epitope appears to be outside the recognition site of the IL-1 receptor and it is therefore most surprising that antibodies to this epitope, e.g. the AAL160 antibody, are capable of inhibiting the binding of IL-1 β to its receptor. Antibodies, in particular chimeric and CDR-grafted antibodies and especially human antibodies, which have binding specificity for the antigenic epitope of mature human IL-1 β which includes the loop comprising residues, Gly 22, Pro 23, Tyr 24 and Glu 25 and which are capable of inhibiting the binding of IL-1 β to its receptor; and use of such antibodies for the treatment of IL-1 mediated diseases and disorders, are novel and are included within the scope of the present invention.

Thus in a further aspect the invention includes an antibody to IL-1 β which has antigen binding specificity for an antigenic epitope of human IL-1 β which includes the loop comprising residues Gly 22, Pro 23, Tyr 24 and Glu 25 of mature human IL-1 β of mature human IL-1 β and which is capable of inhibiting the binding of IL-1 β to its receptor.

In yet further aspects the invention includes:

- i) use of an antibody to IL-1 β , which has antigen binding specificity for an antigenic epitope of mature human IL-1 β which includes the loop comprising residues Gly 22, Pro 23, Tyr 24 and Glu 25 and which is capable of inhibiting the binding of IL-1 β to its receptor, for the treatment of an IL-1 mediated disease or disorder;

29
76

- ii) a method for the treatment of an IL-1 mediated disease or disorders in a patient which comprises administering to the patient an effective amount of an antibody to IL-1 β , which has antigen binding specificity for an antigenic epitope of mature human IL-1 β which includes the loop comprising residues Gly 22, Pro 23, Tyr 24 and Glu 25 and which is capable of inhibiting the binding of IL-1 β to its receptor;
- iii) a pharmaceutical composition comprising an antibody to IL-1 β , which has antigen binding specificity for an antigenic epitope of mature human IL-1 β which includes the loop comprising residues Gly 22, Pro 23, Tyr 24 and Glu 25 and which is capable of inhibiting the binding of IL-1 β to its receptor, in combination with a pharmaceutically acceptable excipient, diluent or carrier; and
- iv) use of an antibody to IL-1 β , which has antigen binding specificity for an antigenic epitope of mature human IL-1 β which includes the loop comprising residues Gly 22, Pro 23, Tyr 24 and Glu 25 and which is capable of inhibiting the binding of IL-1 β to its receptor, for the preparation of a medicament for the treatment of an IL-1 mediated disease or disorder.

For the purposes of the present description an antibody is "capable of inhibiting the binding of IL-1 β " if the antibody is capable of inhibiting the binding of IL-1 β to its receptor substantially to the same extent as the AAL160 antibody, wherein "to the same extent" has meaning as defined above.

In the present description the phrase "IL-1 mediated disease" encompasses all diseases and medical conditions in which IL-1 plays a role, whether directly or indirectly, in the disease or medical condition, including the causation, development, progress, persistence or pathology of the disease or condition.

In the present description the terms "treatment" or "treat" refer to both prophylactic or preventative treatment as well as curative or disease modifying treatment, including treatment of patient at risk of contracting the disease or suspected to have contracted the disease as well as patients who are ill or have been diagnosed as suffering from a disease or medical condition, and includes suppression of clinical relapse.

Antibodies which have binding specificity for the antigenic epitope of mature human IL-1 β which includes the loop comprising residues Gly 22, Pro 23, Tyr 24 and Glu 25 and which are capable of inhibiting the binding of IL-1 β to its receptor are hereinafter referred to as Antibodies of the Invention. Preferably Antibodies of the Invention are antibodies which have binding specificity for this epitope of human IL-1 β when the human IL-1 β is under native, e.g. normal physiological conditions, not under denatured conditions, e.g. not in the presence of a denaturing agent such as SDS. Antibodies of the Invention may cross-react with non-human IL-1 β s, which have antigenic epitopes which include Gly at residue 22, Pro at residue 23, Tyr at residue 24 and Glu at residue 25 and which are closely similar to the corresponding human epitope. For example, Antibodies of the Invention may cross-react with primate IL-1 β s, such as rhesus monkey or cynomolgus monkey IL-1

Preferably the Antibodies of the Invention are IL-1 β binding molecules according to the first and second aspects of the invention. Advantageously the Antibodies of the Invention are human antibodies, most preferably the AAL160 antibody or direct equivalent thereof.

The Antibodies of the Invention block the effects of IL-1 β on its target cells and thus are indicated for use in the treatment of IL-1 mediated diseases and disorders. These and other pharmacological activities of the Antibodies of the Invention may be demonstrated in standard test methods for example as described below:

1. Neutralization of human IL-1 β -mediated activation of the IL-8 promoter

The potential to neutralize IL-1 β -dependent cellular signaling is determined in a reporter gene assay.

The human melanoma cell line G361 is stably transfected with a luciferase reporter gene construct based on the human IL-8 promoter. Reporter gene expression and activity is dependent on IL-1 β or TNF α in this cell line. Cells are stimulated with 300pg/ml of recombinant human IL-1 β or the equivalent of 100 pg/ml in conditioned medium in the presence of various concentrations of Antibody of the Invention or IL-1 receptor antagonist ranging between 6 and 18,000 pM. The chimeric antibody Simulect[®] (basiliximab) is used as a matched isotype control. Luciferase activity is quantified in a chemiluminescence assay. Antibodies of the Invention typically have IC₅₀ of about 1nM (e.g. from about 0.2 to about 5nM) when tested in this assay.

2. **Neutralization of IL-1 β dependent production of PGE₂ and interleukin-6 by primary human fibroblasts**

The production of PGE₂ and IL-6 in primary human dermal fibroblasts is dependent on IL-1 β . TNF- α alone cannot efficiently induce these inflammatory mediators, but synergizes with IL-1. Primary dermal fibroblasts are used as a surrogate model for IL-1-induced cellular activation.

Primary human fibroblasts are stimulated with recombinant IL-1 β or conditioned medium obtained from LPS-stimulated human PBMCs in the presence of various concentrations of Antibody of the Invention or IL-1RA ranging from 6 to 18,000 pM. The chimeric anti-CD25 antibody Simulect[®] (basiliximab) is used as a matched isotype control. Supernatant is taken after 16 h stimulation and assayed for IL-6 by ELISA or PGE₂ by RIA. Antibodies of the Invention typically have IC₅₀s for inhibition of IL-6 production of about 1 nM or less (e.g. from about 0.1 to about 1 nM) and for inhibition of PGE₂ production of about 1nM (e.g. from about 0.5 to about 2 nM) when tested as above.

As indicated in the above assays Antibodies of the Invention potently block the effects of IL-1 β . Accordingly, the Antibodies of the Invention have pharmaceutical utility as follows:

Antibodies of the Invention are useful for the prophylaxis and treatment of IL-1 mediated diseases or medical conditions, e.g. inflammatory conditions, allergies and allergic conditions, hypersensitivity reactions, autoimmune diseases, severe infections, and organ or tissue transplant rejection.

For example, Antibodies of the Invention may be use for the treatment of recipients of heart, lung, combined heart-lung, liver, kidney, pancreatic, skin or corneal transplants and for the prevention of graft-versus-host disease, such as following bone marrow transplant.

Antibodies of the Invention are particularly useful for the treatment, prevention, or amelioration of autoimmune disease and of inflammatory conditions, in particular inflammatory conditions with an aetiology including an autoimmune component such as arthritis (for example rheumatoid arthritis, arthritis chronica progrediente and arthritis deformans) and rheumatic

diseases, including inflammatory conditions and rheumatic diseases involving bone loss, inflammatory pain, hypersensitivity (including both airways hypersensitivity and dermal hypersensitivity) and allergies. Specific auto-immune diseases for which Antibodies of the Invention may be employed include autoimmune haematological disorders (including e.g. hemolytic anaemia, aplastic anaemia, pure red cell anaemia and idiopathic thrombocytopenia), systemic lupus erythematosus, polychondritis, scleroderma, Wegener granulomatosis, dermatomyositis, chronic active hepatitis, myasthenia gravis, psoriasis, Steven-Johnson syndrome, idiopathic sprue, autoimmune inflammatory bowel disease (including e.g. ulcerative colitis, Crohn's disease and Irritable Bowel Syndrome), endocrine ophthalmopathy, Graves disease, sarcoidosis, multiple sclerosis, primary biliary cirrhosis, juvenile diabetes (diabetes mellitus type I), uveitis (anterior and posterior), keratoconjunctivitis sicca and vernal keratoconjunctivitis, interstitial lung fibrosis, psoriatic arthritis and glomerulonephritis (with and without nephrotic syndrome, e.g. including idiopathic nephrotic syndrome or minimal change nephropathy).

Antibodies of the Invention are also useful for the treatment, prevention, or amelioration of asthma, bronchitis, pneumoconiosis, pulmonary emphysema, and other obstructive or inflammatory diseases of the airways

Antibodies of the Invention are useful for treating undesirable acute and hyperacute inflammatory reactions which are mediated by IL-1 or involve IL-1 production, especially IL-1 β , or the promotion of TNF release by IL-1, e.g. acute infections, for example septic shock (e.g., endotoxic shock and adult respiratory distress syndrome), meningitis, pneumonia; and severe burns; and for the treatment of cachexia or wasting syndrome associated with morbid TNF release, consequent to infection, cancer, or organ dysfunction, especially AIDS -related cachexia, e.g., associated with or consequential to HIV infection.

Antibodies of the Invention are particularly useful for treating diseases of bone metabolism including osteoarthritis, osteoporosis and other inflammatory arthritides, and bone loss in general, including age-related bone loss, and in particular periodontal disease.

For these indications, the appropriate dosage will, of course, vary depending upon, for example, the particular Antibody of the Invention to be employed, the host, the mode of administration and the nature and severity of the condition being treated. However, in

87
78

prophylactic use, satisfactory results are generally indicated to be obtained at daily dosages from about 0.1 mg to about 5 mg per kilogram body weight. Antibody of the Invention is conveniently administered parenterally, intravenously, e.g. into the antecubital or other peripheral vein, intramuscularly, or subcutaneously. A prophylactic treatment typically comprises administering the molecule of the invention once daily to once weekly for 2 to 4 weeks.

Pharmaceutical compositions of the invention may be manufactured in conventional manner. A composition according to the invention is preferably provided in lyophilized form. For immediate administration it is dissolved in a suitable aqueous carrier, for example sterile water for injection or sterile buffered physiological saline. If it is considered desirable to make up a solution of larger volume for administration by infusion rather as a bolus injection, it is advantageous to incorporate human serum albumin or the patient's own heparinised blood into the saline at the time of formulation. The presence of an excess of such physiologically inert protein prevents loss of antibody by adsorption onto the walls of the container and tubing used with the infusion solution. If albumin is used, a suitable concentration is from 0.5 to 4.5% by weight of the saline solution.

The invention is further described by way of illustration only in the following Examples which refer to the accompanying Figures:

Figure 1 which is a graph showing competitive inhibition of AAL160 binding to IL-1 β by soluble IL-1 type I and type II receptors;

Figure 2 which is a graph showing inhibition of IL-1 β -induced fever in a rat model by AAL160, and

Figure 3 which is a graph showing duration of action of AAL160 in rat IL-1 β -induced fever.

EXAMPLES

Transgenic mice engineered to express the human IgG/k repertoire instead of the murine immunoglobulin repertoire (Fishwild et al., 1996, Nat Biotechnol., 14, 845-851) are used to generate antibodies to human IL-1 β . B cells from these mice are immortalized by standard hybridoma technology and murine hybridoma cells are obtained which secrete the human IgG1/k antibody AAL160

Example 1: Generation of the hybridoma and purification of the antibody

Genetically engineered mouse 66 (Medarex Inc. Annadale, NJ) is immunized with recombinant human IL-1 β (50 μ g) s.c. in several sites in adjuvant. The mouse is boosted five additional times with the last injection three days before the fusion. On the day of the fusion mouse 66 is killed by CO₂ inhalation and spleen cells (4.1×10^7) are fused by a routine method using PEG 4000 with an equal number of PAI-O cells, a mouse myeloma cell line. Fused cells are plated out in 624 wells (1ml/well) containing a feeder layer of mouse peritoneal cells (Balb C mice), in HAT supplemented RPMI 1640, 10% heat inactivated fetal calf serum 5×10^{-5} M β -mercaptoethanol. Supernatants are collected and tested in ELISA and screened for IL-1 β reactive monoclonal antibodies. Five monoclonal antibodies of the IgG/k subclass are identified. Cloning is done using 4 x 96 well microtiter plates, plating 0.5 cells per well. After two weeks wells are inspected with an inverted microscope. Supernatant is collected from wells positive for growth and production of anti-IL-1 β monoclonal antibodies is evaluated by ELISA. 1-2L of conditioned supernatant from four subclones of the originally identified hybridoma # 476 are prepared and antibodies are purified by affinity chromatography on a protein A column.

Purity and partial amino acid sequences of heavy and light chain

Amino acid sequencing

Light and heavy chains of the purified antibody AAL160 are separated by SDS-PAGE and the amino-terminal amino acids determined by Edman degradation. The purity of the antibody used in these studies is $\geq 90\%$ by sequencing. cDNA sequences coding for the heavy and light chain variable domains are obtained by PCR amplification of cDNA obtained from mRNA from the cloned hybridoma cells and fully sequenced. The amino-terminal sequences of heavy and light

chain variable domains and the corresponding DNA sequences are given in Seq. Id no. 1 and Seq Id No. 2 below, in which the CDRs are shown in bold type.

Seq. Id no. 1

	30	60
GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG AAG ATC		
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile		
	10	20
	90	120
TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AGC TTT ACC AGC TAC TGG ATC GGC TGG GTG CGC CAG ATG	CDR1	
Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met		
	30	40
	150	180
CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TAT CCT AGT GAC TCT GAT ACC AGA TAC	CDR2	
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Asp Thr Arg Tyr		
	50	60
	210	240
AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC GAC AAG TCC ATC AGC ACC GCC TAC		
Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr		
	70	80
	270	300
CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG GAC ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA TAT ACC		
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Thr		
	90	100
	330	
AAC TGG GAT GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA	CDR3	
Asn Trp Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser		

Seq. Id no. 2

	30	60
GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC		
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr		
	10	20
	90	120
CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC CAA CAG AAA CCT	CDR1	
Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro		
	30	40
	150	180
GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GCC	CDR2	

4-31289/P1

Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
50 60

210 240
AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTT GAG CCT
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
70 80

270 CDR3 300
GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG CGT AGC AAC TGG ATG TTC CCT TTT GGC CAG
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Met Phe Pro Phe Gly Gln
90 100

GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

Construction of expression vectors for heavy and light chain

The cloned V_L and V_H encoding sequences were amplified by PCR and inserted via appropriate restriction sites into cassette vectors providing the immunoglobulin promoter, the leader sequences from the RFT2 antibody (Heinrich et al. (1989) J. Immunol. 143, 3589-97), part of the J-segments and a splice donor site. The light chain cassette containing the entire V_L region, promoter and leader sequence for secretion was transferred into an expression vector containing the human Ck gene, the immunoglobulin heavy chain enhancer, and the modified murine dhfr cDNA for selection by methotrexate (MTX).

The heavy chain cassette was transferred accordingly into an expression vector encoding the human IgG1 gene, the immunoglobulin heavy chain enhancer, and the neomycin resistance gene for selection.

Both heavy and light chain are in a configuration in the expression vectors that resembles the genomic configuration of rearranged immunoglobulin genes which is thought to be crucial for high level expression.

For Antibody production the above vectors are co-transfected into an appropriate host cell line, e.g. the SP2/0 cell line, cells containing the vector sequences are selected by methotrexate selection, and selected cell lines are cultured to express the AAL160 antibody. Alternatively a GS based amplification/selection system such as that described in EP 0256055 B, EP 0323997 B or European patent application 89303964.4 may be used, in which case the dhfr selectable marker is replaced by a GS coding sequence.

85
86

Example 2: Biochemical and Biological Data

The monoclonal antibody AAL160 is found to neutralize the activity of interleukin-1 β in vitro. The monoclonal antibody is further characterized for its binding to recombinant human IL-1 β Biacore analysis. The mode of neutralization is assessed by competitive binding studies with soluble IL-1 receptors. The biological activity of the antibody AAL160 towards recombinant and naturally produced IL-1 β is determined in primary human cell (Example 3), responsive to stimulation by IL-1 β .

2.1 Determination of dissociation equilibrium constant

The association and dissociation rate constant for the binding of recombinant human IL-1 β to AAL160 is determined by BIAcore analysis. AAL160 is immobilized, and binding of recombinant IL-1 β in a concentration range from 0.5 to 12 nM is measured by surface plasmon resonance. The chosen format permits treating the binding event of IL-1 β to AAL160 according to a 1:1 stoichiometry. Data analysis is performed using the BIAevaluation software.

Association rate constant [M ⁻¹ s ⁻¹]	(n=15)	(3.91 $\pm$ 0.14) $\times 10^5$	Mean $\pm$ SEM
Dissociation rate constant [s ⁻¹]	(n=15)	(1.53 $\pm$ 0.05) $\times 10^{-4}$	Mean $\pm$ SEM
Dissociation equilibrium constant K _D [M]	(n=15)	(396.6 $\pm$ 19.5) $\times 10^{-12}$	Mean $\pm$ SEM

AAL160 binds to recombinant human IL-1 β with a high affinity.

2.2 Competitive inhibition of binding to soluble IL-1 receptors

Binding competition study with soluble IL-1 type I and II receptors

Competition between AAL160 and soluble human IL-1 type I and type II receptors is measured by Biacore. AAL160 is immobilized on the chip surface and recombinant human IL-1 β (8nM) is injected for binding to AAL160 in absence or presence of increasing concentrations of recombinant human soluble receptor I (0-10nM) or receptor II (0-80nM). The results obtained are shown in Figure 1. Binding of NVP AAL160 NX-1 to IL-1 β is competitive with both IL-1 receptor type I and type II

2.3. Reactivity profile to human IL-1 α , human IL-1RA, and IL-1 β from rodent and monkey species

The reactivity profile of AAL160 to human IL-1 α , IL-1RA, and murine, rat, rabbit and cynomolgus monkey IL-1 β is determined by Biacore analysis. AAL160 is immobilized, and the cytokines examined are applied at a concentration of 8 nM (or 20 nM in the case of IL-1 β .)

	Percent of total binding $\pm$ SEM
Human IL-1 β	100
Human IL-1 α	0.7 $\pm$ 0.7 (n=3)
Human IL-1Ra	1.2 $\pm$ 1.2 (n=3)
Mouse IL-1 β	2.8 $\pm$ 1.5 (n=3)
Rat IL-1 β	3.0 $\pm$ 2.5 (n=3)
Cynomolgus IL-1 β	96.4 $\pm$ 6.8 (n=3)
Rabbit IL-1 β	12.1 $\pm$ 2.3 (n=4)

AAL160 does not significantly crossreact with human IL-1 α , human IL-1Ra, or murine, rat or rabbit IL-1 β . The reactivity towards cynomolgus monkey IL-1 β is virtually identical to the human cytokine.

Example 3: Neutralization of IL-1 β - dependent production of PGE₂ and interleukin-6 by primary human fibroblasts

The production of PGE₂ and IL-6 in primary human dermal fibroblasts is dependent on IL-1 β . TNF- α alone cannot efficiently induce these inflammatory mediators, but synergizes with IL-1. Primary dermal fibroblasts are used as a surrogate model for IL-1 induced cellular activation.

Primary human fibroblasts are stimulated with recombinant IL-1 β or conditioned medium obtained from LPS-stimulated human PBMCs in the presence of various concentrations of AAL160 or IL-1RA ranging from 6 to 18,000 pM. The chimeric anti-CD25 antibody Simulect[®] (basiliximab) is used as a matched isotype control. Supernatant is taken 16 hours after stimulation and is assayed for IL-6 by ELISA or PGE₂ by RIA.

	AAL160 IC₅₀ ± SEM (n ≥ 3)	IL-1 Ra IC₅₀ ± SEM (n ≥ 3)
IL-6 secretion Recombinant	0.34 ± 0.037 nM	n.d.
IL-6 secretion cond. Medium	0.6 ± 0.09 nM	0.03 ± 0.001 nM
PGE₂ production cond. Medium	0.79 ± 0.17 nM	n.d.

AAL160 effectively blocks production of IL-6 and PGE₂ in human dermal fibroblasts with an IC₅₀ similar for both the recombinant and natural IL-1β.

Example 4: In vivo efficacy and duration of action of AAL160

Efficacy:

The *in vivo* efficacy of the anti-huIL-1β antibody, AAL 160 is tested in a rat model where fever is induced by an i.v. injection of huIL-1β (100 ng/rat). The antibody causes a dose related inhibition of the fever response over the dose range 1, 3 and 10μg/kg i.v. (n=6 rats) – see Figure 2. CHI 621 (Simulect®, basiliximab) is used as the control antibody.

Duration of Action:

The duration of action of AAL-160 is investigated in rat IL-1β-induced fever as follows: The antibody is injected i.v. either 24 hours or 30 minutes (standard protocol) before the induction of fever by an i.v. injection of human IL-1β, and body temperature measured 2 and 4 hours later. A similar degree of inhibition of the fever response is seen at both times (see Figure 3). As expected, the control antibody CHI 621 (Simulect®, basiliximab) is ineffective at both time-points. This finding indicates that the AAL160 human antibody is present in an active form for at least 24 hours in the rat and is not metabolised, excreted or bound in the tissues during this time.

Example 5: X-ray studies of AAL160 Fab and its complex with IL-1 β **Structure determination of AAL160 Fab at 2.0Å resolution:**

A 2.0Å resolution data set of very good quality ($R_{\text{sym}} = 0.051$, completeness = 99.9%, redundancy = 8.2) was collected from an Fab crystal grown by the vapour diffusion in hanging drop technique, at pH 9.5 in 50% PEG 200, 0.1M CHES. The crystal was in space group $P2_12_12_1$ with unit cell dimensions $a=62.17\text{\AA}$ $b=89.83\text{\AA}$ $c=123.73\text{\AA}$ and one Fab molecule per symmetric unit (Matthews coefficient : $3.6 \text{ \AA}^3/\text{Da}$, estimated solvent content: 66%). The structure was determined by molecular replacement and was refined to a final crystallographic R-factor of 0.209 (free R-factor = 0.261). The final model includes residues 1-213 of the light chain, 1-131 and 138-218 of the heavy chain, 387 water molecules and 1 PEG molecule. The final electron density is well defined for all CDR residues but Trp 94 (CDR3) of the light chain. The position of the side-chain of this residue is ill defined in the two crystal forms which were examined to date, thus suggesting that it is highly mobile in the absence of a bound antigen.

Crystallization of the Fab complex with IL-1 β and preliminary experimental model of the complex: a few crystals of AAL160 Fab in complex with the antigen IL-1 β were obtained from a 76mg/ml stock solution of the 1:1 complex in 2.0M ammonium sulfate, 0.1M Tris pH 8.5. The crystals grew very slowly over a period of several weeks. They diffracted weakly to about 3.2Å on the home source. A preliminary data set was collected and molecular replacement was attempted using the high resolution structures of the free Fab and of human IL-1 β (J.P. Priestle et al., EMBO J. 7, 339 (1988)) as starting models. The calculations yielded a very clear and unambiguous solution when the Fv and Fc parts of the Fab were used as separate modules (correlation 67.1%, R-factor 0.354 after the AMORE FITTING step, using data between 8.0 and 3.5Å). The subsequent comparison of the free and bound forms of the Fab showed that the elbow angle is very different in the two structures. The results of the molecular replacement calculations provide a first molecular model of the interactions between the antigen IL-1 β and the monoclonal antibody AAL160. A preliminary analysis of these interactions indicates that 1) IL-1 β makes tight interactions to all three CDRs of the heavy chain and to CDR3 of the light chain. In contrast, few interactions if any involve CDR1 and CDR2 of the light chain. 2) The loop comprising residues Gly 22, Pro 23, Tyr 24 and Glu 25 of mature IL-1 β binds at the centre of the antigen-combining site and thus appears to be a key component of the epitope. Interestingly enough, this loop is not located in the region of the molecule that differs most from mouse IL-1 β . Pro 23, Tyr 24 and Glu 25 are conserved, but residue 22 is a Gly in human IL-1 β and an Asp in

4-31289/P1

mouse IL-1 β . Comparison of the crystal structures of human (PDB entry 2ilb) and mouse IL-1 β (PDB entry 8ilb) shows that this point mutation results in a very different conformation of the main-chain around Pro 23. This local structural difference is consistent with the observed lack of cross-reactivity of AAL160 with respect to the mouse cytokine.

CLAIMS

1. An IL-1 β binding molecule which comprises an antigen binding site comprising at least one immunoglobulin heavy chain variable domain (V_H) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1, CDR2 and CDR3, said CDR1 having the amino acid sequence Ser-Tyr-Trp-Ile-Gly, said CDR2 having the amino acid sequence Ile-Ile-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ser-Asp-Thr-Arg-Tyr-Ser-Pro-Ser-Phe-Gln-Gly, and said CDR3 having the amino acid sequence Tyr-Thr-Asn-Trp-Asp-Ala-Phe-Asp-Ile; and direct equivalents thereof.
2. An IL-1 β binding molecule comprising both heavy (V_H) and light chain (V_L) variable domains in which said IL-1 β binding molecule comprises at least one antigen binding site comprising:
 - a) an immunoglobulin heavy chain variable domain (V_H) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1, CDR2 and CDR3, said CDR1 having the amino acid sequence Ser-Tyr-Trp-Ile-Gly, said CDR2 having the amino acid sequence Ile-Ile-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ser-Asp-Thr-Arg-Tyr-Ser-Pro-Ser-Phe-Gln-Gly, and said CDR3 having the amino acid sequence Tyr-Thr-Asn-Trp-Asp-Ala-Phe-Asp-Ile, and
 - b) an immunoglobulin light chain variable domain (V_L) which comprises a CDR3' hypervariable region having the amino acid sequence Gln-Gln-Arg-Ser-Asn-Trp-Met-Phe-Pro;and direct equivalents thereof.
3. An IL-1 β binding molecule according to claim 2, in which the immunoglobulin light chain variable domain (V_L) comprises in sequence hypervariable regions CDR1', CDR2' and CDR3', said CDR1' having the amino acid sequence Arg-Ala-Ser-Gln-Ser-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Ala, said CDR2' having the amino acid sequence Asp-Ala-Ser-Asn-Arg-Ala-Thr, and said CDR3' having the amino acid sequence Gln-Gln-Arg-Ser-Asn-Trp-Met-Phe-Pro; and direct equivalents thereof.
4. An IL-1 β binding molecule according to claim 1, 2 or 3 which is a human antibody.

5. An IL-1 β binding molecule which comprises at least one antigen binding site comprising either a first domain having an amino acid sequence substantially identical to that shown in Seq. Id. No. 1 starting with amino acid at position 1 and ending with amino acid at position 128 or a first domain as described above and a second domain having an amino acid sequence substantially identical to that shown in Seq. Id. No. 2, starting with amino acid at position 1 and ending with amino acid at position 107.
6. A first DNA construct encoding a heavy chain or fragment thereof which comprises
 - a) a first part which encodes a variable domain comprising alternatively framework and hypervariable regions, said hypervariable regions being in sequence CDR1, CDR2 and CDR3 the amino acid sequences of which are shown in Seq. Id. No. 1; this first part starting with a codon encoding the first amino acid of the variable domain and ending with a codon encoding the last amino acid of the variable domain, and
 - b) a second part encoding a heavy chain constant part or fragment thereof which starts with a codon encoding the first amino acid of the constant part of the heavy chain and ends with a codon encoding the last amino acid of the constant part or fragment thereof, followed by a stop codon.
7. A second DNA construct encoding a light chain or fragment thereof which comprises
 - a) a first part which encodes a variable domain comprising alternatively framework and hypervariable regions; said hypervariable regions being CDR3' and optionally CDR1' and CDR2', the amino acid sequences of which are shown in Seq. Id. No. 2; this first part starting with a codon encoding the first amino acid of the variable domain and ending with a codon encoding the last amino acid of the variable domain, and
 - b) a second part encoding a light chain constant part or fragment thereof which starts with a codon encoding the first amino acid of the constant part of the light chain and ends with a codon encoding the last amino acid of the constant part or fragment thereof followed by a stop codon.
8. An expression vector able to replicate in a prokaryotic or eukaryotic cell line which comprises at least one DNA constructs according to claim 6 or claim 7.

9. A process for the product of an IL-1 β binding molecule which comprises (i) culturing an organism which is transformed with an expression vector according to claim 8 and (ii) recovering the IL-1 β binding molecule from the culture.
10. An antibody to IL-1 β which has antigen binding specificity for an antigenic epitope of mature human IL-1 β which includes the loop comprising residues Gly 22, Pro 23, Tyr 24 and Glu 25 and which is capable of inhibiting the binding of IL-1 β to its receptor.
11.
 - i) use of an antibody to IL-1 β , which has antigen binding specificity for an antigenic epitope of mature human IL-1 β which includes the loop comprising residues Gly 22, Pro 23, Tyr 24 and Glu 25 and which is capable of inhibiting the binding of IL-1 β to its receptor, for the treatment of an IL-1 mediated disease or disorder;
 - ii) a method for the treatment of an IL-1 mediated disease or disorders in a patient which comprises administering to the patient an effective amount of an antibody to IL-1 β , which has antigen binding specificity for an antigenic epitope of mature human IL-1 β which includes the loop comprising residues Gly 22, Pro 23, Tyr 24 and Glu 25 and which is capable of inhibiting the binding of IL-1 β to its receptor;
 - iii) a pharmaceutical composition comprising an antibody to IL-1 β , which has antigen binding specificity for an antigenic epitope of mature human IL-1 β which includes the loop comprising residues Gly 22, Pro 23, Tyr 24 and Glu 25 and which is capable of inhibiting the binding of IL-1 β to its receptor, in combination with a pharmaceutically acceptable excipient, diluent or carrier; and
 - iv) use of an antibody to IL-1 β , which has antigen binding specificity for an antigenic epitope of mature human IL-1 β which includes the loop comprising residues Gly 22, Pro 23, Tyr 24 and Glu 25 and which is capable of inhibiting the binding of IL-1 β to its receptor, for the preparation of a medicament for the treatment of an IL-1 mediated disease or disorder.
12. All novel compounds, processes, methods and uses substantially as hereinbefore described with particular reference to the Examples.

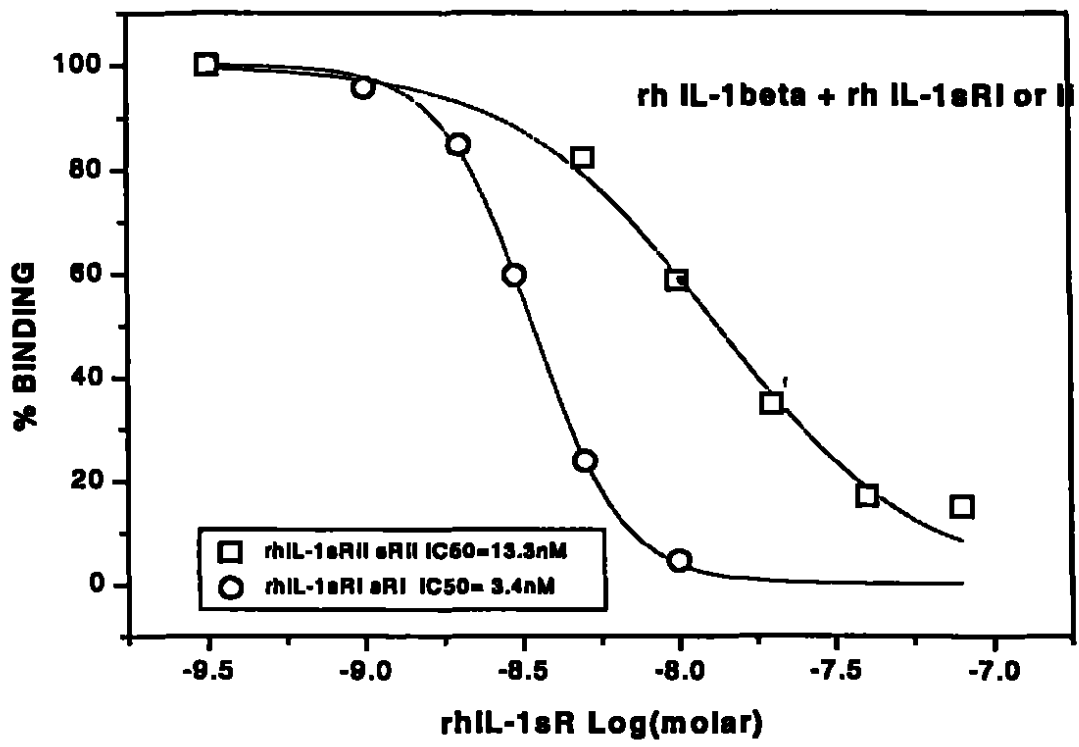


Figure 1

Figure 2.

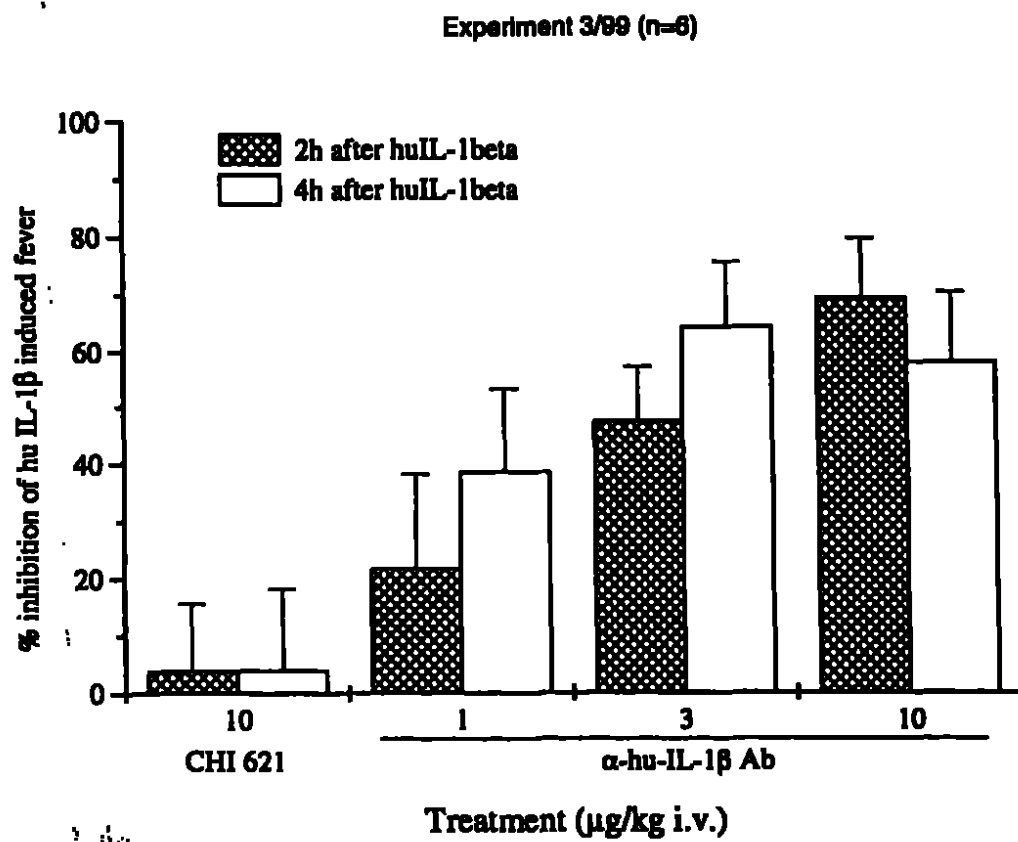
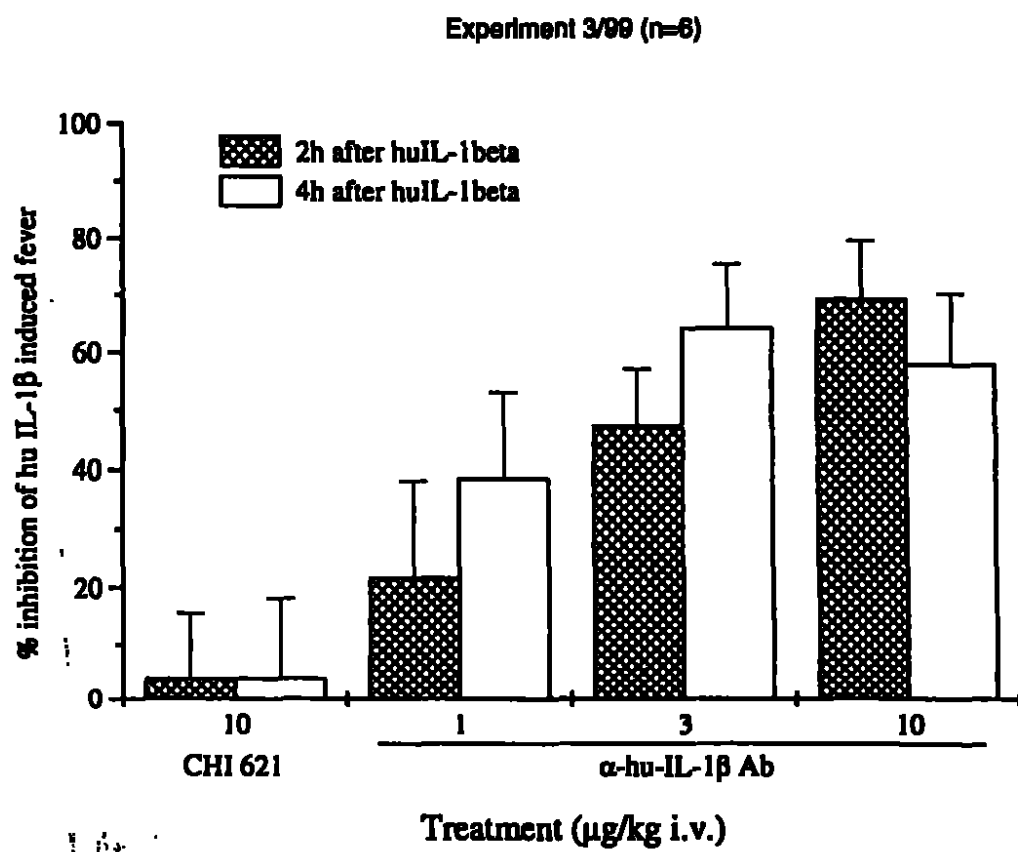


Figure 3

2/3

Figure 2.



LA OFICINA DE PATENTES

La Oficina de Patentes
Concept House
Cardiff Road
Newport
Gales del Sur
NP10 8QQ

Yo, el suscrito, siendo un funcionario debidamente autorizado de acuerdo con la Sección 74(1) y (4) de la Ley de Desregulación y Contratación Externa de 1994, para firmar y expedir certificados a nombre del Contralor General, mediante la presente certifico que el anexo es una copia fiel de los documentos tal como se presentaron originalmente en relación con la Solicitud de Patente identificada en los mismos.

De acuerdo con las Reglas de Patentes (Re-registro de Sociedades) de 1982, si una sociedad nombrada en este certificado y en cualesquiera documentos acompañantes, se ha re-registrado, de acuerdo con la Ley de Sociedades de 1980, con el mismo nombre que aquél con el que se registró inmediatamente antes del re-registro, salvo por la sustitución como, o la inclusión como, la última parte del nombre con las palabras "sociedad pública limitada" o sus equivalentes en Galo, las referencias al nombre de la sociedad en este certificado y en cualesquiera documentos acompañantes, se tratarán como referencias al nombre con el cual así se re-registró.

97
88

De acuerdo con las reglas, las palabras "sociedad pública limitada" pueden ser reemplazadas por s.p.l., spl, S.P.L., ó SPL.

El re-registro según la Ley de Sociedades no constituye una nueva entidad legal, sino que meramente sujeta a la sociedad a ciertas reglas adicionales de la ley de sociedades.

Firma: (Firmado)

Fecha: 15 de noviembre de 2000.

Una Agencia Ejecutiva del Departamento
de Comercio e Industria

(Aparece un sello móvil de la Oficina de Patentes).

Forma de Patentes 1/77

1/77

24JAN00 E507293-1 D00524

P01/7700 0.00 - 0001448.0

Ley de Patentes de 1977

(Regla 16)

(Aparece un sello ovalado impreso con la siguiente leyenda:

LA OFICINA DE PATENTES

21 DE ENERO DE 2000

RECIBIDO PERSONALMENTE).

LA OFICINA DE PATENTES

La Oficina de Patentes
Cardiff Road
Newport
Gwent NP9 1RH

SOLICITUD PARA LA CONCESION DE UNA PATENTE

(Ver las notas al reverso de esta forma. También puede obtener un folleto de explicaciones en la Oficina de Patentes, para ayudarle a llenar esta forma).

1. Su referencia: 4-31289P1
2. Número de Solicitud de Patente:
(La Oficina de Patentes llenará esta parte)

Forma de Patentes 1/77

~~8~~
96

0001448.0

3. Nombre completo, domicilio, y código postal de cada solicitante (*subraye todos los apellidos*):

NOVARTIS AG

SCHWARZWALDALLEE 215

4058 BASILEA

SUIZA

Número ADP de Patentes (*si lo conoce*):

7125487002

Si el solicitante es un cuerpo corporativo, dé el país/estado de su incorporación:

SUIZA

4. Título de la invención:

COMPUESTOS ORGANICOS

5. Nombre de su agente (*si tiene alguno*):

B. A. YORKE & CO.

AGENTES DE PATENTES AUTORIZADOS

"Dirección para notificaciones" en el Reino Unido, a donde se debe enviar toda la correspondencia (*incluyendo el código postal*):

COOMB HOUSE, 7 ST. JOHN'S ROAD

91

ISLEWORTH

MIDDLESEX TW7 6NH

Número ADP de Patentes (si lo conoce):

1800001

6. Si está declarando prioridad a partir de una o más solicitudes de patente anteriores, dé el país y la fecha de presentación de cada una de estas solicitudes anteriores, y (si lo conoce) cada número de solicitud:

País: . - - -

Número de solicitud de prioridad (si lo sabe): - - -

Fecha de presentación (día/mes/año): - - -

7. Si esta solicitud está dividida o se deriva de otra manera de una solicitud anterior del Reino Unido, dé el número y la fecha de presentación de la solicitud anterior:

Número de solicitud anterior: - - -

Fecha de presentación (día/mes/año): - - -

8. ¿Es una declaración de invención y del derecho de otorgar una patente requerida en apoyo de esta solicitud? (Conteste "Sí" en el caso de que:

25
92

- a) cualquier solicitante nombrado en la parte 3 no sea un inventor, ó
- b) haya un inventor que no esté nombrado como un solicitante, ó
- c) cualquier solicitante nombrado sea un cuerpo corporativo.

Ver la nota (d)): **sí**

9. Anote el número de páginas para cualquiera de los siguientes artículos que esté presentando con esta forma. No cuente las copias del mismo documento.

Páginas de continuación de esta forma	--
Descripción	25
Reivindicaciones	3
Resumen	--
Dibujo(s)	3

10. Si también está presentando cualquiera de los siguientes, informe cuántas en cada uno de los puntos.

Documentos de prioridad: --

Traducción de documentos de prioridad: --

Declaración de invención y derecho a la concesión de una patente (Forma de Patentes 7/77): --

Forma de Patentes 1/77

28
93

Solicitud de examen preliminar y búsqueda (Forma de Patentes 9/77): Una

Solicitud de examen sustantivo (Forma de Patentes 10/77): --

Cualesquiera otros documentos (por favor especifique):

11. Solicitamos la concesión de una patente con base en esta solicitud.

Firma: B. A. Yorke & Co.

(Firmado)

Fecha: 21.01.00

12. Nombre y número telefónico diurno de la persona para hacer contacto en el Reino Unido:

SRA. E. CHEETHAM

020 8560 5847

Advertencia

Después de que se haya presentado una solicitud de patente, el Contralor de la Oficina de Patentes considerará si se debe prohibir o restringir la publicación o comunicación de la invención, de acuerdo con la Sección 22 de la Ley de Patentes de 1977. Se le informará si es necesario prohibir o restringir su invención de esta manera. Además, si usted vive en el Reino

Forma de Patentes 1/77

Forma de Patentes 1/77

Unido, la Sección 23 de la Ley de Patentes de 1977 le impide solicitar una patente en el extranjero sin obtener primero un permiso por escrito de la Oficina de Patentes, a menos que se haya presentado una solicitud cuando menos 6 semanas antes en el Reino Unido para una patente para la misma invención, y no se hayan dado instrucciones que prohíban la publicación o la comunicación, o se hayan revocado dichas instrucciones.

Notas

- a) Si necesita ayuda para llenar esta forma, o tiene alguna pregunta, por favor haga contacto con la Oficina de Patentes al 0645 500505.
- b) Escriba sus respuestas en letras mayúsculas, utilizando tinta negra, o puede mecanografiarlas.
- c) Si no hay suficiente espacio para todos los detalles pertinentes en cualquier parte de esta forma, por favor continúe en una hoja de papel separada, y escriba "ver página de continuación" en las partes pertinentes. Cualquier página de continuación se debe adjuntar a esta forma.
- d) Una vez que haya llenado la forma, debe recordar firmarla y fecharla.
- e) Para los detalles de los derechos y de las maneras de pagar, por favor haga contacto con la Oficina de Patentes.

COMPUESTOS ORGANICOS

Esta invención se refiere a anticuerpos para interleucina I beta humana (IL-1 β), y al uso de estos anticuerpos para el tratamiento de enfermedades y desórdenes mediados por IL-1.

La interleucina I (IL-1) es una actividad producida por las células del sistema inmune que actúa como un mediador de la respuesta inflamatoria en fase aguda. La producción inapropiada o excesiva de IL-1, en particular IL-1 β , está asociada con la patología de diferentes enfermedades y desórdenes, tales como septicemia, choque séptico o endotóxico, alergias, asma, pérdida ósea, isquemia, embolia, artritis reumatoide, y otros desórdenes inflamatorios. Se han propuesto los anticuerpos para IL-1 β para utilizarse en el tratamiento de enfermedades y desórdenes mediados por IL-1; ver, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 95/01997 y la discusión en su introducción.

Ahora hemos preparado anticuerpos mejorados para IL-1 β humana, para utilizarse en el tratamiento de enfermedades y desórdenes mediados por IL-1.

De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona una molécula de enlace de IL-1 β , la cual comprende un sitio de enlace de antígeno que comprende cuando menos un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H), que

4-31289/P1

~~96~~
96

comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1, CDR2, y CDR3, teniendo la CDR1 la secuencia de aminoácidos Ser-Tyr-Trp-Ile-Gly, teniendo la CDR2 la secuencia de aminoácidos Ile-Ile-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ser-Asp-Thr-Arg-Tyr-Ser-Pro-Ser-Phe-Gln-Gly, y teniendo la CDR3 la secuencia de aminoácidos Tyr-Thr-Asn-Trp-Asp-Ala-Phe-Asp-Ile; y sus equivalentes directos.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una molécula de enlace de IL-1 de un solo dominio, que comprende una cadena pesada de inmunoglobulina aislada que comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H), como se define anteriormente.

En un segundo aspecto, la invención también proporciona una molécula de enlace de IL-1 β que comprende dominios variables de cadena tanto pesada (V_H) como ligera (V_L), en donde la molécula de enlace de IL-1 β comprende cuando menos un sitio de enlace de antígeno que comprende:

a) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H), el cual comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1, CDR2, y CDR3, teniendo la CDR1 la secuencia de aminoácidos Ser-Tyr-Trp-Ile-Gly, teniendo la CDR2 la secuencia de aminoácidos Ile-Ile-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ser-Asp-Thr-Arg-Tyr-Ser-Pro-Ser-Phe-Gln-Gly, y teniendo la CDR3 la secuencia de aminoácidos Tyr-Thr-Asn-Trp-Asp-Ala-Phe-Asp-Ile, y

b) un dominio variable de cadena ligera de

4-31289/P1

inmunoglobulina (V_L), el cual comprende una región hipervariable CDR3' que tiene la secuencia de aminoácidos Gln-Gln-Arg-Ser-Asn-Trp-Met-Phe-Pro;

y sus equivalentes directos.

En las modalidades particulares del segundo aspecto, la invención proporciona una molécula de enlace de IL-1 β dominios variables de cadena tanto pesada (V_H) como ligera (V_L), en donde la molécula de enlace de IL-1 β comprende cuando menos un sitio de enlace de antígeno que comprende:

a) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H), el cual comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1, CDR2, y CDR3, teniendo la CDR1 la secuencia de aminoácidos Ser-Tyr-Trp-Ile-Gly, teniendo la CDR2 la secuencia de aminoácidos Ile-Ile-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ser-Asp-Thr-Arg-Tyr-Ser-Pro-Ser-Phe-Gln-Gly, y teniendo la CDR3 la secuencia de aminoácidos Tyr-Thr-Asn-Trp-Asp-Ala-Phe-Asp-Ile, y

b) un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L), el cual comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1', CDR2', y CDR3', teniendo la CDR1' la secuencia de aminoácidos Arg-Ala-Ser-Gln-Ser-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Ala, teniendo la CDR2' la secuencia de aminoácidos Asp-Ala-Ser-Asn-Arg-Ala-Thr, y teniendo la CDR3' la secuencia de aminoácidos Gln-Gln-Arg-Ser-Asn-Trp-Met-Phe-Pro;

y sus equivalentes directos.

A menos que se indique de otra manera, cualquier

4-31289/P1

101
98

cadena de polipéptido se describe en la presente teniendo una secuencia de aminoácidos empezando en la extremidad N-terminal, y terminando en la extremidad C-terminal. Cuando el sitio de enlace de antígeno comprende ambos dominios V_H y V_L , éstos se pueden localizar sobre la misma molécula de polipéptido, o de preferencia, cada dominio puede estar en una cadena diferente, siendo el dominio V_H parte de una cadena pesada de inmunoglobulina o fragmento de la misma, y siendo el V_L parte de una cadena ligera de inmunoglobulina o fragmento de la misma.

"Molécula de enlace de IL-1 β " significa cualquier molécula capaz de enlazarse con el antígeno IL-1 β , ya sea sola, o bien asociada con otras moléculas. La reacción de enlace se puede mostrar mediante métodos convencionales (ensayos cualitativos) incluyendo, por ejemplo, un bioensayo para determinar la inhibición del enlace de IL-1 β con su receptor, o cualquier clase de ensayos de enlace, con referencia a una prueba de control negativo en donde se utiliza un anticuerpo de una especificidad no relacionada pero del mismo isotipo, por ejemplo un anticuerpo anti-CD25. De una manera conveniente, el enlace de las moléculas de enlace de IL-1 β de la invención con IL-1 β , se puede demostrar en un ensayo de enlace competitivo.

Los ejemplos de las moléculas de enlace de antígeno incluyen anticuerpos como son producidos por las células B o hibridomas, y anticuerpos quiméricos, injertados con CDR, o

4-31289/P1

humanos, o cualquier fragmento de los mismos, por ejemplo $F(ab')_2$ y fragmentos Fab, así como anticuerpos de una sola cadena o de un solo dominio.

Un anticuerpo de una sola cadena consiste en los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo covalentemente enlazado por un enlazador peptídico que normalmente consiste en 10 a 30 aminoácidos, de preferencia en 15 a 25 aminoácidos. Por consiguiente, esta estructura no incluye la parte constante de las cadenas pesada y ligera, y se cree que el separador de péptido pequeño debe ser menos antigénico que una parte constante entera. "Anticuerpo quimérico" significa un anticuerpo en donde las regiones constantes de las cadenas pesada o ligera o ambas, son de origen humano, mientras que los dominios variables de ambas cadenas pesada y ligera son de origen no humano (por ejemplo murino), o de origen humano pero derivado de un anticuerpo humano diferente. "Anticuerpo injertado con CDR" significa un anticuerpo en donde las regiones hipervariables (CDRs) se derivan de un anticuerpo donador, tal como un anticuerpo no humano (por ejemplo murino), o un anticuerpo humano diferente, mientras que todas, o sustancialmente todas las demás partes de la inmunoglobulina, por ejemplo las regiones constantes y las partes altamente conservadas de los dominios variables, es decir, las regiones de estructura, se derivan de un anticuerpo aceptor, por ejemplo un anticuerpo de origen humano. Sin

4-31289/P1

embargo, un anticuerpo injertado con CDR puede contener unos pocos aminoácidos de la secuencia donadora en las regiones de estructura, por ejemplo en las partes de las regiones de estructura adyacentes a las regiones hipervariables. "Anticuerpo humano" significa un anticuerpo en donde las regiones constantes y variables de ambas cadenas pesada y ligera son todas de origen humano, o sustancialmente idénticas a secuencias de origen humano, no necesariamente a partir del mismo anticuerpo, e incluye anticuerpos producidos por ratones en donde los genes de la parte variable y constante de inmunoglobulina de murino han sido reemplazados por sus contrapartes humanas, por ejemplo como se describe en términos generales en las Patentes Números EP 0546073 B1, USP 5545806, USP 5569825, USP 5625126, USP 5633425, USP 5661016, USP 5770429, EP 0 438474 B1 y EP 0 463151 B1.

Las moléculas de enlace de IL-1 β particularmente preferidas de la invención son anticuerpos humanos, especialmente el anticuerpo AAL 160 como se describe posteriormente en la presente en los Ejemplos.

Por consiguiente, en los anticuerpos quiméricos preferidos, los dominios variables de ambas cadenas pesada y ligera son de origen humano, por ejemplo aquéllas del anticuerpo AAL 160, que se muestran en la SEQ ID NO:1, y en la SEQ ID NO:2. Los dominios de la región constante de preferencia también comprenden dominios humanos adecuados de la región

4-31289/P1

constante, por ejemplo como se describen 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.

Las regiones hipervariables se pueden asociar con cualquier clase de regiones de estructura, aunque de preferencia son de origen humano. Las regiones de estructura adecuadas se describen en Kabat E.A. y colaboradores, *ibid*. La estructura de cadena pesada preferida es una estructura de cadena pesada humana, por ejemplo, aquella del anticuerpo AAL 160, que se muestra en la SEQ ID NO:1. Consiste en la secuencia de las regiones FR1, FR2, FR3, y FR4. De una manera similar, la SEQ ID NO:2 muestra la estructura de cadena ligera ALL 160 preferida que consiste, en secuencia, en las regiones FR1', FR2', FR3', y FR4'.

De acuerdo con lo anterior, la invención también proporciona una molécula de enlace de IL-1 β que comprende cuando menos un sitio de enlace de antígeno que comprende ya sea un primer dominio que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la mostrada en la SEQ ID NO:1, empezando con el aminoácido en la posición 1, y terminando con el aminoácido en la posición 118, o bien un primer dominio como se describe anteriormente, y un segundo dominio que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la mostrada en la SEQ ID NO:2, empezando con el aminoácido en la posición

65
p2

1, y terminando con el aminoácido en la posición 107.

Los anticuerpos monoclonales reproducidos contra una proteína que se encuentra naturalmente en todos los seres humanos, normalmente se desarrollan en un sistema no humano, por ejemplo en ratones. Como una consecuencia directa de esto, un anticuerpo xenogénico como es producido por un hibridoma, cuando se administra a seres humanos, provoca una respuesta inmune indeseable que es predominantemente mediada por la parte constante de la inmunoglobulina xenogénica. Esto limita claramente el uso de estos anticuerpos, debido a que no se pueden administrar durante un período de tiempo prolongado. Por consiguiente, se prefiere particularmente utilizar anticuerpos de una sola cadena, de un solo dominio, quiméricos, injertados con CDR, o especialmente humanos, que no tengan probabilidades de provocar una respuesta alérgica sustancial cuando se administren a seres humanos.

En vista de lo anterior, una molécula de enlace de IL-1 más preferida de la invención se selecciona a partir de un anticuerpo humano anti-IL-1 β , el cual comprende cuando menos:

a) una cadena pesada de inmunoglobulina o fragmento de la misma que comprende: (i) un dominio variable que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1, CDR2, y CDR3, y (ii) la parte constante o fragmento de la misma de una cadena pesada humana; teniendo la CDR1 la secuencia de aminoácidos Ser-Tyr-Trp-Ile-Gly, teniendo la CDR2 la secuencia

4-31289/P1

10/8
103

de aminoácidos Ile-Ile-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ser-Asp-Thr-Arg-Tyr-Ser-Pro-Ser-Phe-Gln-Gly, y teniendo la CDR3 la secuencia de aminoácidos Tyr-Thr-Asn-Trp-Asp-Ala-Phe-Asp-Ile, y

b) una cadena ligera de inmunoglobulina o fragmento de la misma que comprende: (i) un dominio variable que comprende la región hipervariable CDR3', y opcionalmente también las regiones hipervariables CDR1', CDR2', y (ii) la parte constante o fragmento de la misma de una cadena ligera humana, teniendo la CDR1' la secuencia de aminoácidos Arg-Ala-Ser-Gln-Ser-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu Ala, teniendo la CDR2' la secuencia de aminoácidos Asp-Ala-Ser-Asn-Arg-Ala-Thr, y teniendo la CDR3' la secuencia de aminoácidos Gln-Gln-Arg-Ser-Asn-Trp-Met-Phe-Pro;

y sus equivalentes directos.

De una manera alternativa, una molécula de enlace de IL-1 β de la invención se puede seleccionar a partir de una molécula de enlace de una sola cadena que comprende un sitio de enlace de antígeno, el cual comprende:

a) un primer dominio que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1, CDR2, y CDR3, teniendo estas regiones hipervariables las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO:1,

b) un segundo dominio que comprende las regiones hipervariables CDR3' y opcionalmente CDR1' y CDR2', teniendo

4-31289/P1

estas regiones hipervariables las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO:2, y

c) un enlazador peptídico que se enlaza ya sea con la extremidad N-terminal del primer dominio y con la extremidad C-terminal del segundo dominio, o bien con la extremidad C-terminal del primer dominio y con la extremidad N-terminal del segundo dominio;

y sus equivalentes directos.

Como es bien conocido, los cambios menores en una secuencia de aminoácidos, tales como supresión, adición, o sustitución de uno, de unos cuantos, o inclusive de varios aminoácidos, pueden conducir a una forma alélica de la proteína original que tiene propiedades sustancialmente idénticas.

Por consiguiente, el término "sus equivalentes directos", significa cualquier molécula de enlace de IL-1 β de un solo dominio (molécula X),

(i) en donde las regiones hipervariables CDR1, CDR2, y CDR3 tomadas como un todo, son cuando menos el 80 por ciento homólogas, de preferencia cuando menos el 90 por ciento homólogas, más preferiblemente cuando menos el 95 por ciento homólogas a las regiones hipervariables mostradas en la SEQ ID NO:1, y

(ii) que sea capaz de inhibir el enlace de IL-1 β con sus receptores sustancialmente hasta el mismo grado que una molécula de referencia que tenga las regiones de estructura

4-31289/P1

idénticas a las de la molécula X, pero que tenga las regiones hipervariables CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a las mostradas en la SEQ ID NO:1,

o cualquier molécula de enlace de IL-1 β que tenga cuando menos dos dominios por sitio de enlace (molécula X'),

(i) en donde las regiones hipervariables CDR1, CDR2, CDR3, CDR3', y opcionalmente CDR1' y CDR2', tomadas como un todo, son cuando menos el 80 por ciento homólogas, de preferencia cuando menos el 90 por ciento homólogas, más preferiblemente cuando menos el 95 por ciento homólogas a las regiones hipervariables mostradas en las SEQ ID NOs:1 y 2, y

(ii) que sea capaz de inhibir el enlace de IL-1 β con sus receptores sustancialmente hasta el mismo grado que una molécula de referencia que tenga las regiones de estructura y las partes constantes idénticas a la molécula X', pero que tenga las regiones hipervariables CDR1, CDR2, CDR3, y CDR3', y opcionalmente CDR1' y CDR2', idénticas a las mostradas en las SEQ ID NOs:1 y 2.

En la presente descripción, las secuencias de aminoácidos son cuando menos el 80 por ciento homólogas unas a otras si tienen cuando menos el 80 por ciento de residuos de aminoácidos idénticos en una posición similar cuando la secuencia quede óptimamente alineada, contándose los huecos o inserciones en las secuencias de aminoácidos como residuos no idénticos.

10/9
106

La inhibición del enlace de IL-1 β con su receptor se puede probar convenientemente en diferentes ensayos, incluyendo los ensayos descritos posteriormente en el texto. El término "hasta el mismo grado" significa que las moléculas de referencia y equivalentes exhiben, sobre una base estadística, curvas de inhibición de enlace de IL-1 β esencialmente idénticas en uno de los ensayos referidos anteriormente.

Por ejemplo, el ensayo utilizado puede ser un ensayo de inhibición competitiva de enlace de IL-1 β por parte de los receptores de IL-1 solubles y las moléculas de enlace de IL-1 β de la invención.

De una manera más preferible, el anticuerpo humano IL-1 β comprende cuando menos:

a) una cadena pesada que comprende un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la mostrada en la SEQ ID NO:1, empezando con el aminoácido en la posición 1, y terminando con el aminoácido en la posición 118, y la parte constante de una cadena pesada humana; y

b) una cadena ligera que comprende un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la mostrada en la SEQ ID NO:2, empezando con el aminoácido en la posición 1, y terminando con el aminoácido en la posición 107, y la parte constante de una cadena ligera humana.

No
107

La parte constante de una cadena pesada humana puede ser del tipo $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4, \mu, \alpha_1, \alpha_2, \delta$, o ϵ , de preferencia del tipo γ , más preferiblemente del tipo γ_1 , mientras que la parte constante de una cadena ligera humana puede ser del tipo κ o λ (que incluye los subtipos λ_1, λ_2 , y λ_3), pero de preferencia es del tipo κ . Las secuencias de aminoácidos de todas estas partes constantes se dan en Kabat y colaboradores, *ibid*.

Una molécula de enlace de IL-1 β de la invención se puede producir mediante técnicas de ADN recombinante. En vista de esto, una o más moléculas de ADN que codifiquen la molécula de enlace se deben construir, colocar bajo secuencias de control apropiadas, y transferir a un organismo hospedero adecuado para su expresión.

De una manera muy general, de acuerdo con lo anterior, se proporcionan:

(i) moléculas de ADN que codifican una molécula de enlace de IL-1 β de un solo dominio, de la invención, una molécula de enlace de IL-1 β de una sola cadena de la invención, una cadena pesada o ligera o fragmentos de las mismas de una molécula de enlace de IL-1 β de la invención, y

(ii) el uso de las moléculas de ADN de la invención para la producción de una molécula de enlace de IL-1 β de la invención mediante medios recombinantes.

El presente estado de la técnica es tal que el experto en este campo puede sintetizar las moléculas de ADN de

4-31289/P1

la invención, dada la información proporcionada en la presente, es decir, las secuencias de aminoácidos de las regiones hipervariables, y las secuencias de ADN que codifican para las mismas. Un método para construir un gen de dominio variable, por ejemplo, se describe en la Patente Número EPA 239 400, y se puede resumir brevemente como sigue: se clona un gen que codifique un dominio variable de un MAb de cualquier especificidad. Se determinan los segmentos de ADN que codifiquen las regiones de estructura e hipervariable, y se remueven los segmentos de ADN que codifiquen las regiones hipervariables, de tal manera que los segmentos de ADN que codifiquen las regiones de estructura se fusionen entre sí con los sitios de restricción adecuados en las uniones. Los sitios de restricción se pueden generar en las posiciones apropiadas mediante mutagénesis de la molécula de ADN mediante procedimientos convencionales. Se preparan casetes de CDR sintéticos de doble cadena mediante síntesis del ADN de acuerdo con las secuencias dadas en las SEQ ID NOs:1 ó 2. Estos casetes están provistos con extremos pegajosos, de tal manera que se puedan ligar en las uniones de la estructura.

Además, no es necesario tener acceso al ARNm a partir de una línea celular de hibridoma de producción con el objeto de obtener una construcción de ADN que codifique para las moléculas de enlace de IL-1 de la invención. Por consiguiente, la solicitud del TCP Número WO 90/07861 da instrucciones

4-31289/P1

completas para la producción de un anticuerpo mediante técnicas de ADN recombinante, dada solamente la información escrita con respecto a la secuencia de nucleótidos del gen. El método comprende la síntesis de un número de oligonucleótidos, su amplificación mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa, y su empalme para dar la secuencia de ADN deseada.

Los vectores de expresión que comprenden un promotor adecuado o genes que codifican las partes constantes de cadena pesada y ligera están públicamente disponibles. Por consiguiente, una vez que se prepara una molécula de ADN de la invención, convenientemente se puede transferir a un vector de expresión apropiado. También se pueden preparar moléculas de ADN que codifiquen anticuerpos de una sola cadena mediante métodos convencionales, por ejemplo, como se describe en la Publicación Internacional Número WO 88/1649.

En vista de lo anterior, no es necesario ningún hibridoma o depósito de línea celular para cumplir con los criterios de suficiencia de la descripción.

En una modalidad particular, la invención incluye primera y segunda construcciones de ADN para la producción de una molécula de enlace de IL-1 β como se describe en seguida:

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

a) una primera parte que codifica un dominio variable que comprende alternadamente regiones de estructura e

43
116

4-31289/P1

hipervariables, siendo las regiones hipervariables en secuencia, CDR1, CDR2, y CDR3, cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en la SEQ ID NO:1; empezando esta primera parte con un codón que codifica el primer aminoácido del dominio variable, y terminando con un codón que codifica el último aminoácido del dominio variable; y

b) una segunda parte que codifica una parte constante de cadena pesada o fragmento de la misma, que empieza con un codón que codifica el primer aminoácido de la parte constante de la cadena pesada, y termina con un codón que codifica el último aminoácido de la parte constante o fragmento de la misma, seguido por un codón de paro.

De preferencia, esta primera parte codifica un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO:1, empezando con el aminoácido en la posición 1, y terminando con el aminoácido en la posición 118. De una manera más preferible, la primera parte tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO:1, empezando con el nucleótido en la posición 1, y terminando con el nucleótido en la posición 354. También de preferencia, la segunda parte codifica la parte constante de una cadena pesada humana, más preferiblemente la parte constante de la cadena humana γ_1 . Esta segunda parte puede ser un fragmento de ADN de origen genómico (comprendiendo intrones), o un fragmento de

4-31289/P1

ADNc (sin intrones).

La segunda construcción de ADN codifica una cadena ligera o fragmento de la misma, y comprende:

a) una primera parte que codifica un dominio variable que comprende alternadamente regiones de estructura e hipervariables; siendo las regiones hipervariables CDR3', y opcionalmente CDR1' y CDR2', cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en la SEQ ID NO:2; empezando esta primera parte con un codón que codifica el primer aminoácido del dominio variable, y terminando con un codón el último aminoácido del dominio variable, y

b) una segunda parte que codifica una parte constante de cadena ligera o fragmento de la misma, que empieza con un codón que codifica el primer aminoácido de la parte constante de la cadena ligera, y termina con un codón que codifica el último aminoácido de la parte constante o fragmento de la misma, seguido por un codón de paro.

De preferencia, esta primera parte codifica un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:2, empezando con el aminoácido en la posición 1, y terminando con el aminoácido en la posición 107. De una manera más preferible, la primera parte tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO:2, empezando con el nucleótido en la posición 1, y terminando con el nucleótido en

4-31289/P1

la posición 321. También de preferencia, la segunda parte codifica la parte constante de una cadena ligera humana, más preferiblemente la parte constante de la cadena humana κ .

La invención también incluye moléculas de enlace de IL-1 β , en donde uno o más de los residuos de CDR1, CDR2, CDR3, CDR1', CDR2', ó CDR3' se cambian desde los residuos mostrados en las SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2; por ejemplo, mediante mutación, por ejemplo mutagénesis sitio-dirigida de las secuencias de ADN correspondientes. La invención incluye las secuencias de ADN que codifican para estas moléculas de enlace de IL-1 β cambiadas. En particular, la invención incluye moléculas de enlace de IL-1 β en donde uno o más residuos de CDR1' ó CDR2' se han cambiado desde los residuos mostrados en la SEQ ID NO:2.

En la primera y la segunda construcciones de ADN, la primera y la segunda partes pueden estar separadas por un intrón, y convenientemente se puede localizar un potenciador en el intrón entre la primera y la segunda partes. La presencia de este potenciador, el cual se transcribe pero no se traduce, puede ayudar a una transcripción eficiente. En las modalidades particulares, la primera y la segunda construcciones de ADN comprenden al potenciador de un gen de cadena pesada convenientemente de origen humano.

Cada una de las construcciones de ADN se coloca bajo el control de secuencias de control adecuadas, en particular

4-31289/P1

bajo el control de un promotor adecuado. Se puede utilizar cualquier clase de promotor, en el entendido de que se adapte al organismo hospedero, en donde las construcciones de ADN se transferirán para su expresión. Sin embargo, si la expresión va a tener lugar en una célula de mamífero, se prefiere particularmente utilizar el promotor de un gen de inmunoglobulina.

El anticuerpo deseado se puede producir en un cultivo celular o en un animal transgénico. Un animal transgénico adecuado se puede obtener de acuerdo con los métodos convencionales, los cuales incluyen microinyección en huevos de la primera y la segunda construcciones de ADN colocadas bajo secuencias de control adecuadas que transfieran los huevos así preparados a las hembras pseudo-preñadas apropiadas, y seleccionando un descendiente que exprese el anticuerpo deseado.

Cuando se producen cadenas de anticuerpos en un cultivo celular, las construcciones de ADN primero se deben insertar en un solo vector de expresión, o en dos vectores de expresión separados pero compatibles, prefiriéndose la última posibilidad.

De acuerdo con lo anterior, la invención también proporciona un vector de expresión capaz de replicarse en una línea celular procariótica o eucariótica que comprenda cuando menos una de las construcciones de ADN descritas anteriormente.

119

Luego se transfiere cada vector de expresión que contenga una construcción de ADN a un organismo hospedero adecuado. Cuando las construcciones de ADN se insertan por separado en dos vectores de expresión, se pueden transferir por separado, es decir, un tipo de vector por célula, o se pueden co-transferir, prefiriéndose esta última posibilidad. Un organismo hospedero adecuado puede ser una bacteria, una levadura, o una línea celular de mamífero, prefiriéndose ésta última. De una manera más preferible, la línea celular de mamífero es de origen linfoide, por ejemplo un mieloma, hibridoma, o una célula B inmortalizada normal, que convenientemente no exprese ninguna cadena pesada o ligera de anticuerpo endógeno.

Para la expresión en células de mamífero, se prefiere que la secuencia codificante de la molécula de enlace de IL-1 β se integre en el ADN de la célula hospedera adentro de un locus que permita o favorezca un alto nivel de expresión de la molécula de enlace de IL-1 β . Las células en donde se integre la secuencia codificante de la molécula de enlace de IL-1 β en estos loci favorables, se pueden identificar y seleccionar con base en los niveles de la molécula de enlace de IL-1 β que expresen. Se puede utilizar cualquier marcador seleccionable adecuado para la preparación de las células hospederas que contengan la secuencia codificante de la molécula de enlace de IL-1 β ; por ejemplo, se puede utilizar un sistema de selección

4-31289/P1

de gen dhfr/metotrexato o equivalente. Los sistemas preferidos para la expresión de las moléculas de enlace de IL-1 β de la invención incluyen sistemas de amplificación/selección basados en GS, tales como los descritos en las Patentes Europeas Números EP 0256055 B, EP 0323997 B, y en la solicitud de Patente Europea Número 89303964.4.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un proceso para la producción de una molécula de enlace de IL-1 β , el cual comprende: (i) cultivar un organismo que se transforma con un vector de expresión como se define anteriormente, y (ii) recuperar la molécula de enlace de IL-1 β a partir del cultivo.

De acuerdo con la invención, se ha encontrado que el anticuerpo AAL 160 tiene especificidad de enlace para el epítipo antigénico de IL-1 β humana, que incluye el ciclo que comprende los residuos Gly 22, Pro 23, Tyr 24, y Glu 25 de la IL-1 β humana madura. (Los residuos Gly 22, Pro 23, Tyr 24, y Glu 25 de la IL-1 β humana madura corresponden a los residuos 138, 139, 140, y 141, respectivamente, del precursor de IL-1 β humano). Este epítipo parece estar afuera del sitio de reconocimiento del receptor de IL-1, y por consiguiente, es más sorprendente que los anticuerpos para este epítipo, por ejemplo, el anticuerpo AAL 160, sean capaces de inhibir el enlace de IL-1 β con su receptor. Los anticuerpos, en particular los anticuerpos quiméricos e insertados con CDR, y

4-31289/P1

especialmente los anticuerpos humanos, que tienen especificidad de enlace para el epítipo antigénico de la IL-1 β humana madura que incluye el ciclo que comprende los residuos Gly 22, Pro 23, Tyr 24, y Glu 25, y que son capaces de inhibir el enlace de IL-1 β con su receptor; y el uso de estos anticuerpos para el tratamiento de enfermedades y desórdenes mediados por IL-1, son novedosos, y se incluyen dentro del alcance de la presente invención.

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la invención incluye un anticuerpo para IL-1 β que tiene especificidad de enlace de antígeno para un epítipo antigénico de IL-1 β humana, que incluye el ciclo que comprende los residuos Gly 22, Pro 23, Tyr 24, y Glu 25 de la IL-1 β humana madura, y que es capaz de inhibir el enlace de IL-1 β con su receptor.

En aspectos todavía adicionales, la invención incluye:

i) el uso de un anticuerpo para IL-1 β , que tiene especificidad de enlace de antígeno para un epítipo antigénico de la IL-1 β humana madura, que incluye el ciclo que comprende los residuos Gly 22, Pro 23, Tyr 24, y Glu 25, y que es capaz de inhibir el enlace de IL-1 β con su receptor, para el tratamiento de una enfermedad o desorden mediado por IL-1;

ii) un método para el tratamiento de una enfermedad o desorden mediado por IL-1 en un paciente, el cual comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo

4-31289/P1

para IL-1 β , que tiene especificidad de enlace de antígeno para un epítipo antigénico de IL-1 β humana madura, que incluye el ciclo que comprende los residuos Gly 22, Pro 23, Tyr 24, y Glu 25, y que es capaz de inhibir el enlace de IL-1 β con su receptor;

iii) una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo para IL-1 β , que tiene especificidad de enlace de antígeno para un epítipo antigénico de IL-1 β humana madura, que incluye el ciclo que comprende los residuos Gly 22, Pro 23, Tyr 24, y Glu 25, y que es capaz de inhibir el enlace de IL-1 β con su receptor, en combinación con un excipiente, diluyente, o vehículo farmacéuticamente aceptable; y

iv) el uso de un anticuerpo para IL-1 β , que tiene especificidad de enlace de antígeno para un epítipo antigénico de IL-1 β humana madura, que incluye el ciclo que comprende los residuos Gly 22, Pro 23, Tyr 24, y Glu 25, y que es capaz de inhibir el enlace de IL-1 β con su receptor, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o desorden mediado por IL-1.

Para los propósitos de la presente descripción, un anticuerpo es "capaz de inhibir el enlace de IL-1 β ", si el anticuerpo es capaz el enlace de IL-1 β con su receptor sustancialmente hasta el mismo grado que el anticuerpo AAL 160, en donde "hasta el mismo grado" tiene el significado definido anteriormente.

12/118

En la presente descripción, la frase "enfermedad mediada por IL-1" abarca todas las enfermedades y condiciones médicas en donde tenga un papel la IL-1, ya sea directa o indirectamente, en la enfermedad o condición médica, incluyendo la provocación, desarrollo, progreso, persistencia, o patología de la enfermedad o condición.

En la presente descripción, los términos "tratamiento" o "tratar", se refieren tanto al tratamiento profiláctico o preventivo, como curativo o el tratamiento modificador de la enfermedad, incluyendo el tratamiento del paciente en riesgo de contraer la enfermedad, o del que se sospeche que ha contraído la enfermedad, así como en pacientes que estén enfermos o hayan sido diagnosticados por sufrir de una enfermedad o condición médica, e incluye la supresión de la reincidencia clínica.

Los anticuerpos que tienen especificidad de enlace para el epítipo antigénico de la IL-1 β humana madura que incluye el ciclo que comprende los residuos Gly 22, Pro 23, Tyr 24, y Glu 25, y que son capaces de inhibir el enlace de IL-1 β con su receptor, son referidos posteriormente en la presente como los Anticuerpos de la Invención. Los Anticuerpos de la Invención de preferencia son los anticuerpos que tienen especificidad de enlace para este epítipo de IL-1 β humana cuando la IL-1 β humana está bajo condiciones fisiológicas nativas, por ejemplo normales, y no bajo condiciones desnaturalizadas, por ejemplo no en la presencia de un agente

4-31289/P1

~~122~~
119

desnaturalizante, tal como SDS. Los Anticuerpos de la Invención pueden reaccionar cruzadamente con las IL-1 β s no humanas, que tengan epítopos antigénicos que incluyan Gly en el residuo 22, Pro en el residuo 23, Tyr en el residuo 24, y Glu en el residuo 25, y que sean muy similares al epítipo humano correspondiente. Por ejemplo, los Anticuerpos de la Invención pueden reaccionar cruzadamente con las IL-1 β s de primate, tal como la IL-1 de mono Rhesus, de mono *Cynomolgus*.

De preferencia, los Anticuerpos de la Invención son moléculas de enlace de IL-1 β de acuerdo con el primero y el segundo aspectos de la invención. De una manera conveniente, los Anticuerpos de la Invención son anticuerpos humanos, más preferiblemente el anticuerpo AAL 160, o su equivalente directo.

Los Anticuerpos de la Invención bloquean los efectos de IL-1 β sobre sus células blanco, y por lo tanto, se indican para utilizarse en el tratamiento de enfermedades y desórdenes mediados por IL-1. Estas y otras actividades farmacológicas de los Anticuerpos de la Invención, se pueden demostrar en métodos de prueba convencionales, por ejemplo como se describen en seguida:

1. Neutralización de la activación mediada por IL-1 β humana del promotor IL-8.

El potencial para neutralizar la señalización celular

4-31289/P1

dependiente de IL-1 β se determina en un ensayo de gen reportero.

La línea celular de melanoma humano G361 se transfecta establemente con una construcción de un gen reportero de luciferasa, basada en el promotor IL-8 humano. La expresión y actividad del gen reportero dependen de IL-1 β ó TNF α en esta línea celular. Las células se estimulan con 300 picogramos/mililitro de IL-1 β humana recombinante, o el equivalente de 100 picogramos/mililitro en un medio acondicionado en la presencia de diferentes concentraciones del Anticuerpo de la Invención o del antagonista receptor IL-1, entre 6 y 18,000 pM. Se utiliza el anticuerpo quimérico Simulect® (basiliximab) como un control de isotipo apareado. La actividad de luciferasa se cuantifica en un ensayo de quimiluminiscencia. Los Anticuerpos de la Invención normalmente tienen una IC₅₀ de aproximadamente 1 nM (por ejemplo, de aproximadamente 0.2 a aproximadamente 5 nM) al probarse en este ensayo.

2. Neutralización de la producción dependiente de IL-1 β de PGE₂ e interleucina-6 mediante fibroblastos humanos primarios.

La producción de PGE₂ e IL-6 en fibroblastos dérmicos humanos primarios depende de la IL-1 β . El TNF- α solo no puede inducir eficientemente estos mediadores inflamatorios, pero se sinergiza con IL-1. Se utilizan fibroblastos dérmicos primarios como un modelo subrogado para la activación celular inducida por IL-1.

12/3/84

Los fibroblastos humanos primarios se estimulan con IL-1 β recombinante o un medio condicionado obtenido de PBMCs humanas estimuladas con LPS en la presencia de diferentes concentraciones del Anticuerpo de la Invención o IL-1RA, de 6 a 18,000 pM. El anticuerpo quimérico anti-CD25, Simulect (basiliximab) se utiliza como un control de isotipo apareado. El sobrenadante se toma después de 16 horas de estímulo, y se ensaya para IL-6 mediante ELISA, o PGE₂ mediante RIA. Los Anticuerpos de la Invención normalmente tienen IC₅₀s para la inhibición de la producción de IL-6 de aproximadamente 1 nM o menos (por ejemplo, de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 1 nM), y para la inhibición de la producción de PGE₂, de aproximadamente 1 nM (por ejemplo, de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 2 nM) cuando se prueban como anteriormente.

Como se indica en los ensayos anteriores, los Anticuerpos de la Invención bloquean potentemente los efectos de la IL-1 β . De acuerdo con lo anterior, los Anticuerpos de la Invención tienen utilidad farmacéutica como sigue:

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

Por ejemplo, los Anticuerpos de la Invención pueden

4-31289/P1

utilizarse para el tratamiento de receptores de trasplantes de corazón, pulmón, corazón-pulmón combinados, hígado, riñón, páncreas, piel, o córnea, y para la prevención de la enfermedad del injerto contra el hospedero, tal como en seguida de un trasplante de médula ósea.

Los Anticuerpos de la Invención son particularmente útiles para el tratamiento, la prevención, o la aminoración de enfermedad autoinmune y de condiciones inflamatorias, en particular condiciones inflamatorias con una etiología que incluya un componente autoinmune, tal como artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis crónica progrediente, y artritis deformans), y enfermedades reumáticas, incluyendo condiciones inflamatorias y enfermedades reumáticas que involucren pérdida ósea, dolor inflamatorio, hipersensibilidad (incluyendo tanto hipersensibilidad de las vías aéreas como hipersensibilidad dérmica), y alergias. Las enfermedades autoinmunes específicas para las cuales se pueden emplear los Anticuerpos de la Invención incluyen desórdenes hematológicos autoinmunes (incluyendo, por ejemplo, anemia hemolítica, anemia aplástica, anemia de glóbulos rojos puros, y trombocitopenia idiopática), lupus eritematoso sistémico, policondritis, esclerodoma, granulomatosis de Wegener, dermatomiocitis, hepatitis activa crónica, miastenia gravis, psoriasis, síndrome de Steven-Johnson, prurito idiopático, enfermedad inflamatoria del intestino autoinmune (incluyendo, por ejemplo, colitis

4-31289/P1

ulcerativa, enfermedad de Crohn, y Síndrome de Intestino Irritable), oftalmopatía endócrina, enfermedad de Graves, sarcoidosis, esclerosis múltiples cirrosis biliar primaria, diabetes juvenil (diabetes melitus tipo I), uveitis (anterior y posterior), queratoconjuntivitis sicca y queratoconjuntivitis bernal, fibrosis pulmonar intersticial, artritis psoriática y glomerulonefritis (con y sin síndrome nefrótico, por ejemplo incluyendo síndrome nefrótico idiopático o nefropatía de cambio mínimo).

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

Los Anticuerpos de la Invención son útiles para el tratamiento de reacciones inflamatorias agudas e hiperagudas indeseables que sean mediadas por IL-1, o que involucren la producción de IL-1, especialmente IL-1 β , o la promoción de la liberación de TNF por parte de IL-1, por ejemplo infecciones agudas, por ejemplo choque séptico (por ejemplo choque endotóxico y síndrome de insuficiencia respiratoria de adultos), meningitis, neumonía; y quemaduras severas; y para el tratamiento de caquexia o síndrome de desecho asociado con liberación mórbida de TNF, a consecuencia de infección, cáncer, o disfunción de órganos, especialmente caquexia relacionada con SIDA, por ejemplo asociada con, o a consecuencia de, infección

4-31289/P1

~~122~~
129

por VIH.

Los Anticuerpos de la Invención son particularmente útiles para el tratamiento de enfermedades del metabolismo óseo, incluyendo osteoartritis, osteoporosis y otros artrítidos inflamatorios, y pérdida ósea en general, incluyendo pérdida ósea relacionada con la edad, y en particular enfermedad periodontal.

Para estas indicaciones, la dosificación apropiada, por supuesto, variará dependiendo, por ejemplo, del Anticuerpo de la Invención particular que se vaya a emplear, del hospedero, del modo de administración, y de la naturaleza y severidad de la condición que se esté tratando. Sin embargo, en el uso profiláctico, en general se indica que se obtienen resultados satisfactorios en dosificaciones diarias de aproximadamente 0.1 miligramo a aproximadamente 5 miligramos por kilogramo del peso corporal. El Anticuerpo de la Invención convenientemente se administra parenteralmente, intravenosamente, por ejemplo en la vena antecubital u otra vena periférica, intramuscularmente, o subcutáneamente. Un tratamiento profiláctico normalmente comprende administrar la molécula de la invención una vez al día a una vez a la semana durante 2 a 4 semanas.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden fabricar de una manera convencional. Una composición de acuerdo con la invención de preferencia se proporciona en una

4-31289/P1

forma liofilizada. Para su administración inmediata, se disuelve en un vehículo acuoso adecuado, por ejemplo agua estéril para inyección o suero fisiológico regulado estéril. Si se considera deseable formar una solución de un volumen mayor para administrarse mediante infusión, en lugar de hacerlo como una inyección de bolo, es conveniente incorporar albúmina de suero humana o la propia sangre heparinizada del paciente en el suero en el momento de la formulación. La presencia de un exceso de esta proteína fisiológicamente inerte previene la pérdida del anticuerpo por adsorción sobre las paredes del recipiente y la tubería utilizados con la solución para infusión. Si se utiliza albúmina, una concentración adecuada es del 0.5 al 4.5 por ciento en peso de la solución salina.

La invención se describe además a manera de ilustración solamente en los siguientes Ejemplos, los cuales se refieren a las Figuras acompañantes:

La Figura 1 es una gráfica que muestra la inhibición competitiva del enlace de AAL 160 con IL-1 β por los receptores IL-1 solubles tipo I y tipo II;

La Figura 2 es una gráfica que muestra la inhibición de la fiebre inducida por IL-1 β en un modelo de rata por AAL 160, y

La Figura 3 es una gráfica que muestra la duración de acción de AAL 160 en fiebre inducida por IL-1 β de rata.

126
126**EJEMPLOS**

Se utilizan ratones transgénicos diseñados para expresar el repertorio humano IgG/k en lugar del repertorio de inmunoglobulina de murino (Fishwild y colaboradores, 1996, Nat Biotechnol., 14, 845-851), para generar anticuerpos para IL-1 β humana. Las células B de estos ratones se immortalizan mediante tecnología de hibridoma convencional, y se obtienen células de hibridoma de murino que secretan el anticuerpo AAL 160 de IgG1/k humano.

Ejemplo 1: Generación del hibridoma y purificación del anticuerpo

El ratón genéticamente diseñado 66 (Medarex Inc. Annadale, NJ) se inmuniza con IL-1 β humana recombinante (50 microgramos) subcutáneamente en varios sitios en un adyuvante. El ratón se refuerza cinco veces adicionales con la última inyección tres días antes de la fusión. En el día de la fusión, el ratón 66 se sacrifica mediante inhalación de CO₂, y se fusionan células del bazo (4.1×10^7) mediante 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 aplican en 624 pozos (1 mililitro/pozo) que contienen una capa de alimentador de células peritoneales de ratón (ratones Balb C), en RPMI 1640 complementado con HAT,

4-31289/P1

suero fetal de becerro inactivado por calor al 10 por ciento, 5×10^{-5} M, β -mercaptoetanol. Los sobrenadantes se recolectan y se prueban en ELISA, y se rastrean para determinar los anticuerpos monoclonales reactivos con IL- 1β . Se identifican cinco anticuerpos monoclonales de la subclase IgG/k. La clonación se hace utilizando 4 placas de microtitulación de 96 pozos, aplicando 0.5 células por pozo. Después de dos semanas se inspeccionan los pozos con un microscopio invertido. El sobrenadante se recolecta de los pozos positivos para el crecimiento, y se evalúa la producción de anticuerpos monoclonales anti-IL- 1β mediante ELISA. Se preparan 1-2 litros de sobrenadante condicionado a partir de cuatro subclones del hibridoma originalmente identificado #476, y se purifican los anticuerpos mediante cromatografía por afinidad sobre una columna de proteína A.

Pureza y secuencias de aminoácidos parciales de cadena pesada y ligera

Secuenciación de Aminoácidos

Las cadenas ligera y pesada del anticuerpo purificado AAL 160 se separan mediante SDS-PAGE, y se determinan los aminoácidos amino-terminales mediante degradación de Edman. La pureza del anticuerpo utilizado en estos estudios es >90 por ciento mediante la secuenciación. Se obtienen secuencias de

4-31289/P1

ADNc que codifican para los dominios variables de cadena pesada y ligera mediante amplificación con reacción en cadena de la polimerasa del ADNc obtenido a partir del ARNm de las células de hibridoma clonadas, y se secuencian completamente. Las secuencias amino-terminales de los dominios variables de cadena pesada y ligera y las secuencias de ADN correspondientes se dan en la SEQ.ID.NO:1 y la SEQ.ID.NO:2, en donde las CDRs se muestran en tipo en negrillas.

SEQ.ID.NO:1

	30	60
GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG AAG ATC		
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile		
	10	20
	30	120
TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AGC TTT ACC AAG TAC TGG ATC GGC TGG GTG CCG CAG ATG	CDR1	
Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met		
	30	40

129

150 CDS3 180
 CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GCG ATC ATC TAT CCT AGT GAC TCT GAT ACC AGA TAC
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Asp Thr Arg Tyr
 50 60

210 240
 AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC GAC AAG TCC ATC AGC ACC GCC TAC
 Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 70 80

270 300
 CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG GAC ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA TAT ACC
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Thr
 90 100

CDS3 330
 AAC TGG GAT GGT TTT GAT ATC TGG GCG CAA GCG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA
 Asn Trp Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

Seq. Id no. 2

30 60
 GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GCG GAA AGA GCC ACC
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
 10 20

CDS1 90 120
 CTC TCC TCC AGG GCG AGT CAG AGT GGT AGC AGC TAC TTA GCG TGG TAC CAA CAG AAA CCT
 Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 30 40

150 CDS2 180
 GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TGC AAC AGG GCG AGT GGC ATC CCA GCC
 Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 50 60

210 240
 AGG TTC AGT GGC AGT GCG TCT GCG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTT GAG CCT
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 70 80

•

GGG ACC AAG CTG .GAG ATC AAA
Gly Thr Lys Leu .Glu Ile Lys

○

El casete de cadena pesada se transfirió de acuerdo con lo anterior a un vector de expresión que codificaba el gen IgG1 humano, el potenciador de cadena pesada de

32
131

4-31289/P1

inmunoglobulina, y el gen de resistencia a neomicina para la selección.

Tanto la cadena pesada como ligera están en una configuración en los vectores de expresión que se parece a la configuración genómica de los genes de inmunoglobulina reconfigurados, que se piensa que son cruciales para un alto nivel de expresión.

Para la producción del anticuerpo, los vectores anteriores se co-transfectan en una línea celular hospedera apropiada, por ejemplo la línea celular SP2/0, se seleccionan las células que contienen las secuencias del vector mediante selección con metotrexato, y las líneas celulares se cultivan para expresar el anticuerpo AAL 160. De una manera alternativa, se puede utilizar un sistema de amplificación/selección basado en GS, tal como el descrito en las Patentes Europeas EP 0256055 B, EP 0323997 B, o en la Solicitud de Patente Europea Número 89303964.4, en cuyo caso, el marcador seleccionable dhfr es reemplazado por una secuencia codificante GS.

Ejemplo 2: Datos bioquímicos y biológicos

Se encuentra que el anticuerpo monoclonal AAL 160 neutraliza la actividad de interleucina-1 β in vitro. El anticuerpo monoclonal se caracteriza además por su enlace con la IL-1 β humana recombinante en el análisis Biacore. El modo de neutralización se evalúa mediante estudios de enlace

135
132

competitivo con receptores IL-1 solubles. La actividad biológica del anticuerpo AAL 160 hacia la IL-1 β recombinante y naturalmente producida, se determina en células humanas primarias (Ejemplo 3), en respuesta al estímulo por IL-1 β .

2.1 Determinación de la constante de equilibrio de disociación

La constante del índice de asociación y de disociación para el enlace de IL-1 β humana recombinante con AAL 160, se determina mediante análisis Biacore. Se inmoviliza AAL 160, y se mide el enlace de IL-1 β recombinante en un rango de concentración de 0.5 a 12 nM, mediante resonancia de plasmón superficial. El formato elegido permite tratar el evento de enlace de IL-1 β con AAL 160 de acuerdo con una estequiometría de 1:1. El análisis de los datos se realiza utilizando el software BIAevaluation.

Constante de índice de asociación ($M^{-1}s^{-1}$)	(n=15)	$(3.91 \pm 0.14) \times 10^5$	Promedio + SEM
Constante de índice de disociación (s^{-1})	(n=15)	$(1.53 \pm 0.05) \times 10^4$	Promedio + SEM
Constante de equilibrio de disociación K_D [M]	(n=15)	$(396.6 \pm 19.5) \times 10^{-12}$	Promedio + SEM

AAL 160 se enlaza con la IL-1 β humana recombinante con una alta afinidad.

2.2 Inhibición competitiva del enlace con los receptores IL-1 solubles

4-31289/P1

Estudio de competencia de enlace con los receptores IL-1 solubles tipos I y II

La competencia entre AAL 160 y los receptores IL-1 humanos tipo I y tipo II se mide mediante Biacore. Se inmoviliza AAL 160 sobre la superficie del chip, y se inyecta IL-1 β humana recombinante (8 nM) para enlazarse con AAL 160 en ausencia o en la presencia de concentraciones crecientes de receptor I (0 - 10 nM) o receptor II (0 - 80 nM) soluble humano recombinante. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1. El enlace de NVP AAL 160 NX-1 a IL-1 β es competitivo tanto con el receptor IL-1 tipo I como tipo II.

2.3. Perfil de reactividad a IL-1 α humana, IL-1RA humana, e IL-1 β de especies de roedor y mono

El perfil de reactividad de AAL 160 a la IL-1 α humana, IL-1RA, e IL-1 β de murino, rata, conejo, y mono *Cynomolgus*, se determina mediante análisis Biacore. Se inmoviliza AAL 160, y se aplican las citocinas examinadas en una concentración de 8 nM (ó 20 nM en el caso de IL-1 β).

	Porcentaje de enlace total + SEM
--	----------------------------------

4-31289/P1

IL-1 β humana	100
IL-1 α humana	0.7 + 0.7 (n=3)
IL-1Ra humana	1.2 + 1.2 (n=3)
IL-1 β de ratón	2.8 + 1.5 (n=3)
IL-1 β de rata	3.0 + 2.5 (n=3)
IL-1 β de <i>Cynomolgus</i>	96.4 + 6.8 (n=3)
IL-1 β de conejo	12.1 + 2.3 (n=4)

AAL 160 no reacciona cruzadamente de una manera significativa con la IL-1 α humana, la IL-1Ra, la IL-1 β de murino, de rata, o de conejo. La reactividad hacia la IL-1 β de mono *Cynomolgus* es virtualmente idéntica a la citocina humana.

Ejemplo 3: Neutralización de la producción dependiente de IL-1 β de PGE₂ e interleucina-6 mediante fibroblastos humanos primarios

La producción de PGE₂ e IL-6 en fibroblastos dérmicos humanos primarios depende de IL-1 β . El TNF- α no puede él solo inducir eficientemente estos mediadores inflamatorios, pero se sinergiza con IL-1. Se utilizan fibroblastos dérmicos primarios como un modelo subrogado para la activación celular inducida por IL-1.

Se estimulan los fibroblastos humanos primarios con IL-1 β recombinante o un medio condicionado obtenido a partir de

4-31289/P1

PBMCs humanas estimuladas con LPS en la presencia de diferentes concentraciones de AAL 160 o IL-1Ra desde 6 hasta 18,000 pM. Se utiliza el anticuerpo quimérico anti-CD25 Simulect (basiliximab) como un control de isotipo apareado. El sobrenadante se toma 16 horas después del estímulo, y se ensaya para determinar la IL-6 mediante ELISA, ó PGE2 mediante RIA.

	AAL160 IC50+SEM (n≥3)	AAL160 IC50+SEM (n≥3)
Secreción de IL-6 recombinante	0.34 ± 0.037 nM	n.d.
Secreción de IL-6 cond. Media	0.6 ± 0.09 nM	0.03 ± 0.001nM
Producción de PGE2 cond. Media	0.79 ± 0.17 nM	n.d.

AAL160 bloquea efectivamente la producción de IL-6 y PGE₂ en fibroblastos dérmicos humanos con una IC₅₀ similar a la IL-1b tanto recombinante como natural.

Ejemplo 4: Eficacia in vivo y duración de acción de AAL160

Eficacia:

Se prueba la eficacia in vivo del anticuerpo anti-huIL-1β, a AAL 160, en un modelo de rata, en donde se induce

139
136

4-31289/P1

fiebre mediante una inyección intravenosa de huIL-1 β (100 nanogramos/rata). El anticuerpo provoca una inhibición relacionada con la dosis de la respuesta de fiebre sobre el rango de dosificación de 1, 3, y 10 microgramos/kilogramo intravenosamente (n=6 ratas) - ver la Figura 2. Se utiliza CHI 621 (Simulect®, basiliximab) como el anticuerpo de control.

Duración de Acción:

Se investiga la duración de acción de AAL 160 en fiebre inducida por IL-1 β de rata como sigue: el anticuerpo se inyecta intravenosamente durante 24 horas o bien 30 minutos (protocolo estándar) antes de la inducción de la fiebre mediante una inyección intravenosa de IL-1 β humana, y se mide la temperatura corporal 2 y 4 horas después. Se ve un grado similar de inhibición de la respuesta de fiebre en ambos tiempos (ver la Figura 3). Como se espera, el anticuerpo de control CHI 621 (Simulect®, basiliximab) es inefectivo en ambos puntos del tiempo. Este descubrimiento indica que el anticuerpo AAL 160 está presente en una forma activa durante cuando menos 24 horas en la rata, y no se metaboliza, se expresa, ni se fija a los tejidos durante este tiempo.

Ejemplo 5: Estudios de rayos X de Fab AAL160 y su complej

4-31289/P1

con IL-1 β **Determinación de la estructura del Fab AAL160 en una resolución de 2.0Å:**

Se recopiló un conjunto de datos de una resolución de 2.0Å de muy buena calidad ($R_{\text{int}} = 0.051$, completitud = 99.9 por ciento, redundancia = 8.2) a partir de un cristal de Fab cultivado mediante la difusión de vapor en la técnica de goteo colgante, a un pH de 9.5 en PEG 200 al 50 por ciento, CHES 0.1 M. El cristal estaba en el grupo de espacio $P2_12_12_1$ con dimensiones de células unitarias $a=62.17\text{\AA}$, $b=89.83\text{\AA}$, $c=123.73\text{\AA}$, y una molécula de Fab por unidad simétrica (coeficiente de Matthews: 3.6 Å³/Da, contenido de solvente estimado: 66 por ciento). La estructura se determinó mediante reemplazo molecular, y se refinó hasta un factor R cristalográfico final de 0.209 (factor R libre = 0.261). El modelo final incluye los residuos 1-213 de la cadena ligera, 1-131 y 138-218 de la cadena pesada, 387 moléculas de agua, y una molécula de PEG. La densidad de electrones final está bien definida para todos los residuos de CDR, salvo Trp 94 (CDR3) de la cadena ligera. La posición de la cadena lateral de este residuo está bien definida en las dos formas del cristal que se examinaron hasta la fecha, sugiriendo de esta manera que es altamente móvil en ausencia de un antígeno enlazado.

Cristalización del complejo Fab con IL-1 β y modelo experimental preliminar del complejo: se obtuvieron unos

4-31289/P1

cuantos cristales de Fab AAL 160 en complejo con el antígeno IL-1 β a partir de una solución de suministro de 76 miligramos/mililitro del complejo 1:1 en sulfato de amonio 2.0M, Tris 0.1 M, pH de 8.5. Los cristales crecieron muy lentamente durante un período de varias semanas. Se difractaron débilmente hasta aproximadamente 3.2Å sobre la fuente inicial. Se recopiló un conjunto de datos preliminar, y se intentó el reemplazo molecular utilizando las estructuras de alta resolución del Fab libre y de la IL-1 β humana (J.P. Priestle y colaboradores, EMBO J. 7, 339 (1988)) como modelos de partida. Los cálculos produjeron una solución muy clara y sin ambigüedades cuando se utilizaron las partes Fv y Fc del Fab como módulos separados (correlación del 67.1 por ciento, factor R 0.354 después del paso de AJUSTE AMORE, utilizando los datos entre 8.0 y 3.5Å). La siguiente comparación de las formas libre y enlazada del Fab mostró que el ángulo del codo es muy diferente en las dos estructuras. Los resultados de los cálculos de reemplazo molecular proporcionan un primer modelo molecular de las interacciones entre el antígeno y IL-1 β y el anticuerpo monoclonal AAL 160. Un análisis preliminar de estas interacciones indica que: 1) IL-1 β hace estrechas interacciones con las tres CDRs de la cadena pesada, y con CDR3 de la cadena ligera. En contraste, pocas interacciones, en su caso, involucran las CDR1 y CDR2 de la cadena ligera. 2) El ciclo que comprende los residuos Gly 22, Pro 23, Tyr 24, y Glu 25 de la

4-31289/P1

IL-1 β madura, se fija en el centro del sitio de combinación de antígeno, y por lo tanto, parece ser un componente clave del epítipo. Es suficientemente interesante que este ciclo no se localice en la región de la molécula que difiere más de la IL-1 β de ratón. Pro 23, Tyr 24, y Glu 25 están conservados, pero el residuo 22 es un Gly en la IL-1 β humana, y un Asp en la IL-1 β de ratón. La comparación de las estructuras del cristal de la IL-1 β humana (PDB anotación 2ilb) y de ratón (PDB anotación 8ilb), muestra que esta mutación puntual da como resultado una conformación muy diferente de la cadena principal alrededor de Pro 23. Esta diferencia estructural local es consistente con la falta observada de reactividad cruzada del AAL 160 con respecto a la citocina de ratón.

140

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de enlace de IL-1 β , la cual comprende un sitio de enlace de antígeno que comprende cuando menos un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H), que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1, CDR2, y CDR3, teniendo la CDR1 la secuencia de aminoácidos Ser-Tyr-Trp-Ile-Gly, teniendo la CDR2 la secuencia de aminoácidos Ile-Ile-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ser-Asp-Thr-Arg-Tyr-Ser-Pro-Ser-Phe-Gln-Gly, y teniendo la CDR3 la secuencia de aminoácidos Tyr-Thr-Asn-Trp-Asp-Ala-Phe-Asp-Ile; y sus equivalentes directos.

2. Una molécula de enlace de IL-1 β que comprende dominios variables de cadena tanto pesada (V_H) como ligera (V_L), en donde la molécula de enlace de IL-1 β comprende cuando menos un sitio de enlace de antígeno que comprende:

a) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H), el cual comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1, CDR2, y CDR3, teniendo la CDR1 la secuencia de aminoácidos Ser-Tyr-Trp-Ile-Gly, teniendo la CDR2 la secuencia de aminoácidos Ile-Ile-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ser-Asp-Thr-Arg-Tyr-Ser-Pro-Ser-Phe-Gln-Gly, y teniendo la CDR3 la secuencia de aminoácidos Tyr-Thr-Asn-Trp-Asp-Ala-Phe-Asp-Ile, y

b) un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L), el cual comprende una región hipervariable CDR3' que tiene la secuencia de aminoácidos Gln-Gln-Arg-Ser-Asn-Trp-Met-Phe-Pro;

4-31289/P1

141

y sus equivalentes directos.

3. Una molécula de enlace de IL-1 β de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1', CDR2', y CDR3', teniendo la CDR1' la secuencia de aminoácidos Arg-Ala-Ser-Gln-Ser-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Ala, teniendo la CDR2' la secuencia de aminoácidos Asp-Ala-Ser-Asn-Arg-Ala-Thr, y teniendo la CDR3' la secuencia de aminoácidos Gln-Gln-Arg-Ser-Asn-Trp-Met-Phe-Pro;

y sus equivalentes directos.

4. Una molécula de enlace de IL-1 β de acuerdo con la reivindicación 1, 2, ó 3, que es un anticuerpo humano.

5. Una molécula de enlace de IL-1 β que comprende cuando menos un sitio de enlace de antígeno que comprende ya sea un primer dominio que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la mostrada en la SEQ.ID.NO:1, empezando con el aminoácido en la posición 1, y terminando con el aminoácido en la posición 128, o bien un primer dominio como se describe anteriormente, y un segundo dominio que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la mostrada en la SEQ ID NO:2, empezando con el aminoácido en la posición 1, y terminando con el aminoácido en la posición 107.

6. Una primera construcción de ADN que codifica una cadena pesada o un fragmento de la misma, que comprende:

a) una primera parte que codifica un dominio

142

4-31289/P1

variable que comprende alternadamente regiones de estructura e hipervariables, siendo las regiones hipervariables en secuencia, CDR1, CDR2, y CDR3, cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en la SEQ ID NO:1; empezando esta primera parte con un codón que codifica el primer aminoácido del dominio variable, y terminando con un codón que codifica el último aminoácido del dominio variable; y

b) una segunda parte que codifica una parte constante de cadena pesada o fragmento de la misma, que empieza con un codón que codifica el primer aminoácido de la parte constante de la cadena pesada, y termina con un codón que codifica el último aminoácido de la parte constante o fragmento de la misma, seguido por un codón de paro.

7. Una segunda construcción de ADN que codifica una cadena ligera o fragmento de la misma, que comprende:

a) una primera parte que codifica un dominio variable que comprende alternadamente regiones de estructura e hipervariables; siendo las regiones hipervariables CDR3', y opcionalmente CDR1' y CDR2', cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en la SEQ.ID.NO:2; empezando esta primera parte con un codón que codifica el primer aminoácido del dominio variable, y terminando con un codón el último aminoácido del dominio variable, y

b) una segunda parte que codifica una parte constante de cadena ligera o fragmento de la misma, que empieza

4-31289/P1

143

con un codón que codifica el primer aminoácido de la parte constante de la cadena ligera, y termina con un codón que codifica el último aminoácido de la parte constante o fragmento de la misma, seguido por un codón de paro.

8. Un vector de expresión capaz de replicarse en una línea celular procariótica o eucariótica, el cual comprende cuando menos una construcción de ADN de acuerdo con la reivindicación 6 o con la reivindicación 7.

9. Un proceso para la producción de una molécula de enlace de IL-1 β , el cual comprende: (i) cultivar un organismo que se transforma con un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 8, y (ii) recuperar la molécula de enlace de IL-1 β a partir del cultivo.

10. Un anticuerpo para IL-1 β que tiene especificidad de enlace de antígeno para un epítipo antigénico de IL-1 β humana, que incluye el ciclo que comprende los residuos Gly 22, Pro 23, Tyr 24, y Glu 25, y que es capaz de inhibir el enlace de IL-1 β con su receptor.

11. i) el uso de un anticuerpo para IL-1 β , que tiene especificidad de enlace de antígeno para un epítipo antigénico de la IL-1 β humana madura, que incluye el ciclo que comprende los residuos Gly 22, Pro 23, Tyr 24, y Glu 25, y que es capaz de inhibir el enlace de IL-1 β con su receptor, para el tratamiento de una enfermedad o desorden mediado por IL-1;

ii) un método para el tratamiento de una enfermedad

144

o desorden mediado por IL-1 en un paciente, el cual comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo para IL-1 β , que tiene especificidad de enlace de antígeno para un epítipo antigénico de IL-1 β humana madura, que incluye el ciclo que comprende los residuos Gly 22, Pro 23, Tyr 24, y Glu 25, y que es capaz de inhibir el enlace de IL-1 β con su receptor;

iii) una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo para IL-1 β , que tiene especificidad de enlace de antígeno para un epítipo antigénico de IL-1 β humana madura, que incluye el ciclo que comprende los residuos Gly 22, Pro 23, Tyr 24, y Glu 25, y que es capaz de inhibir el enlace de IL-1 β con su receptor, en combinación con un excipiente, diluyente, o vehículo farmacéuticamente aceptable; y

iv) el uso de un anticuerpo para IL-1 β , que tiene especificidad de enlace de antígeno para un epítipo antigénico de IL-1 β humana madura, que incluye el ciclo que comprende los residuos Gly 22, Pro 23, Tyr 24, y Glu 25, y que es capaz de inhibir el enlace de IL-1 β con su receptor, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o desorden mediado por IL-1.

12. Todos los compuestos, procesos, y usos sustancialmente novedosos como se describió anteriormente en la presente con referencia particular en los Ejemplos.

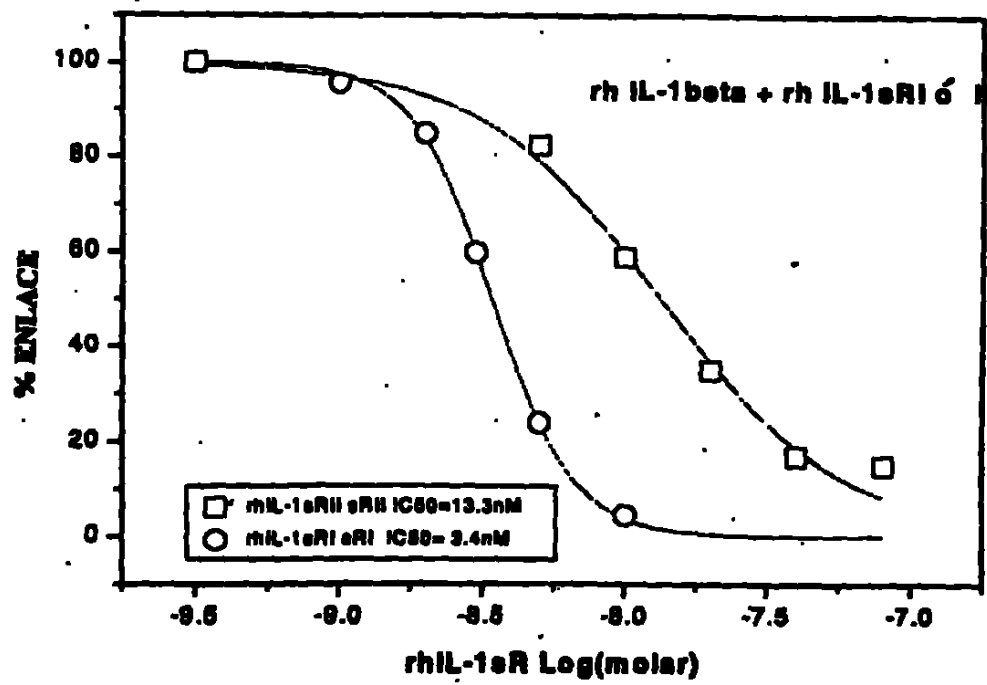
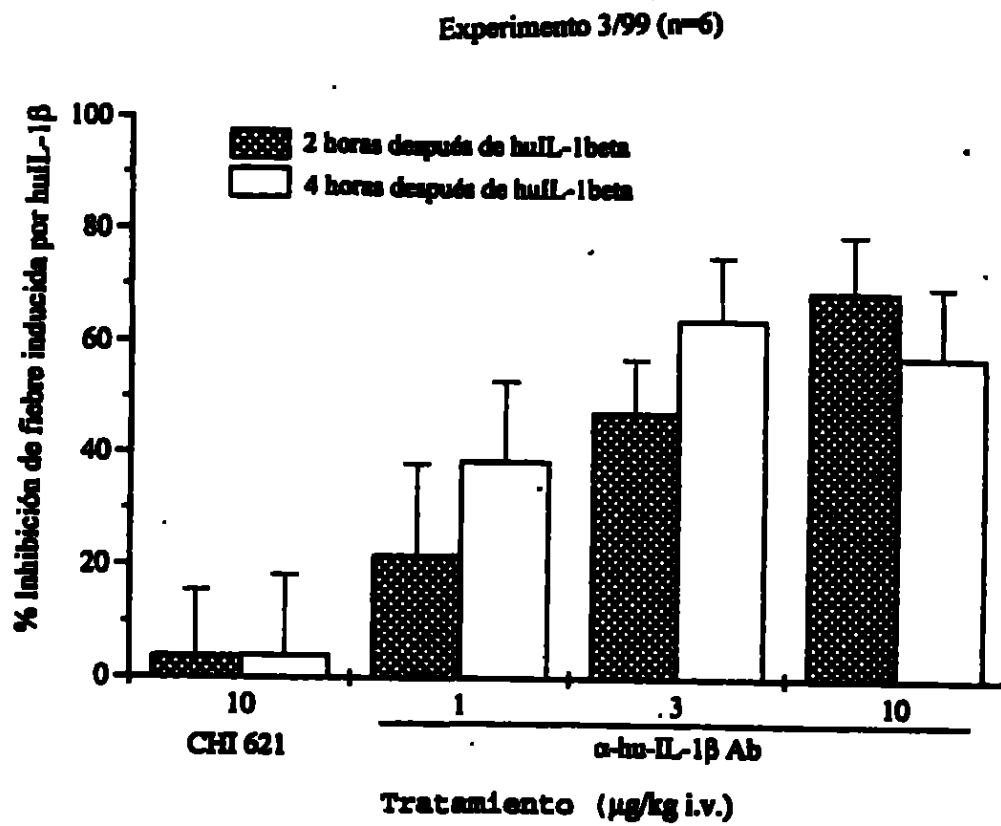


Figure 1

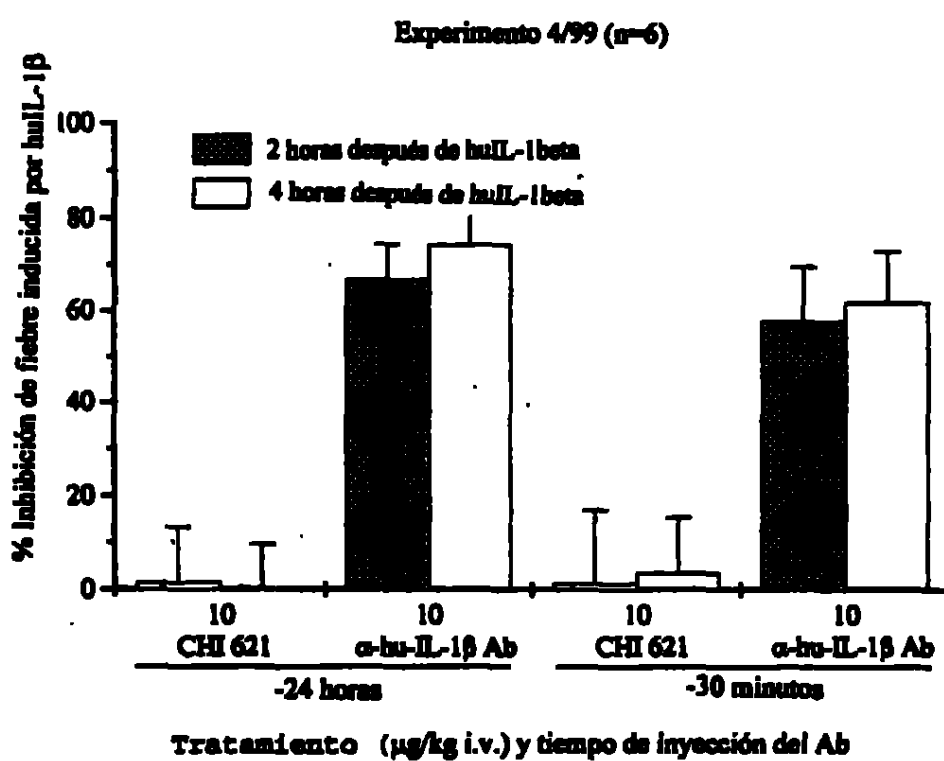
149
106

Figura 2



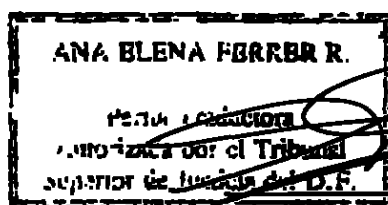
158
147

Figura 3



Yo, ANA ELENA FERRER RAMÍREZ, Perita Traductora Autorizada por el Tribunal Superior de Justicia del D.F., y miembro de la Organización Mexicana de Traductores, A.C., con domicilio en Av. Clavería 224-205, Col. Clavería, México, D.F. 02080, Tels. 5396 2669 y 5396 5201, certifico que el documento precedente es, a mi leal saber y entender, una traducción fiel y exacta del documento original en idioma inglés que tuve a la vista.

México, D.F., 25 de enero del 2001.



Ana Elena Ferrer Ramírez