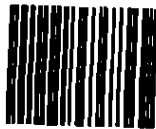


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



01 3434

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 01003434 00000000

Fecha (AMB): 2001-01-18 15:50:17

Trámite : 002 PATENTES D

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Folios: 66

1 REGISTRA/ 411 PRESENTA

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social

NOVARTIS AG

No. de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

País de Domicilio

SUIZA

Departamento o Estado

Dirección

Ciudad

BASILEA

Teléfono

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre

JIMENA ESCOBAR URIBE

Dirección y Domicilio

CRA. 11A No. 94-76. OFICINA 305

Ciudad

SANTAFÉ DE BOGOTÁ

Teléfono 6 162831461

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es)

1. HERMANN GRAM; 2. FRANCO E. DI PADOVA

Identificación

Dirección

1. WEIL ALEMANIA; 2. BIRSFELDEN SUIZA

Ciudad

Teléfono

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención ANTICUERPOS PARA IL-18 HUMANA

PRIORIDAD REIVINDICADA:

SI



NO



TIPO DE PRIORIDAD:

ANDINA



UNIONISTA



(33) País GRAN BRETAÑA

Fecha ENERO 21, 2000

(31) No. Solicited 9281442.0

Para publicar a los



6 meses



12 meses



18 meses a partir de la fecha de la presente solicitud

(51) CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A61K 39/395

2422/P

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

Proveer una molécula de enlace de IL-1 β , en particular un anticuerpo para IL-1 β humana, especialmente un anticuerpo para IL-1 β humana, en donde las CDRs de las cadenas pesada y ligera tienen secuencias de aminoácidos como se definen, para utilizarse en el tratamiento de una enfermedad o desorden mediado por IL-1, por ejemplo osteoartritis, osteoporosis, y otros artrítidos inflamatorios.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

Certificado de existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica No. 17.398	☒
Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la SIC No. 17.398	☒
Recibo de la tasa respectiva No. 78, 532	☒
Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación	☐
Si se reivindica prioridad Andina:	
Copia de la primera solicitud	☐
Traducción oficial	☐
Si se reivindica prioridad Unionista:	
Copia certificada de la primera solicitud:	☐
Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior	
Traducción simple	☐
Capítulo descriptivo	☒
Dibujos planos necesarios	☐
Capítulo reivindicatorio	☒
Tarjeta archivo propiedad según formato	☒
Tarjeta archivo temático según formato	☒
Extracto para publicación según formato	☒
Arte final 12 x 12 cms Y 6x6 cms	☐
Otros documentos	☐

SOLICITO LA CONCESIÓN DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA
NOMBRE


JIMENA ESCOBAR URIBE

C.C. 38.779.452 Usaquén.

T.P. No. 68.228

2422



2

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 800170007-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 01003434 00000000

Folios: 66

Fecha (MM): 2001-01-18 15:50:17

Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTM

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 78,532
FECHA : DICIEMBRE 26 DE 2000

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	Nº. PAGO	Vr. PAGO
ESCORBAR URIBE ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTÁ	050-00110-6	2747522	10,377,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. HISTÓRICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01 01 SOLICITUDES	1 TRÁMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	603,000.00
	TOTAL :	603,000.00

CON: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

FIRMANTE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE N°.

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
 Conmutador: 382 0840
 Fax: 350 5220
 e-mail: info@sic.gov.co
 www.sic.gov.co
 Bogotá, D.C., Colombia

Solicito expresamente a nombre de la sociedad
NOVARTIS AG., sociedad constituida de
conformidad con las leyes de Suiza., domiciliada en
Basilea, Suiza, el otorgamiento de Patente para la
invención titulada " **ANTICUERPOS PARA IL-1 β**
HUMANA".

Clase : A61


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

4

1

ANTICUERPOS PARA IL-1 β HUMANA

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

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-
5 Gln-Gly, y teniendo la CDR3 la secuencia de aminoácidos Tyr-Thr-Asn-Trp-Asp-Ala-Phe-Asp-Ile; y sus equivalentes directos. B1

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
10 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
15 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
20 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

25 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;

y sus equivalentes directos.

5 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:

10 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-
15 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
20 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.

25 A menos que se indique de otra manera, cualquier

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

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

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.

5 "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
10 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
15 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.

20 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
25 también comprenden dominios humanos adecuados de la región

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.

5 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

10 cadena pesada humana, por ejemplo, aquélla 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',

15 FR2', FR3', y FR4'.

De acuerdo con lo anterior, la invención también proporciona B4una 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

20 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

25 en la SEQ ID NO:2, empezando con el aminoácido en la posición

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

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
5 de la misma que comprende: (i) un dominio variable que comprende la región hipervariable CDR30', 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
10 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.

15

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:

20 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
25 hipervariables CDR3' y opcionalmente CDR1' y CDR2', teniendo

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

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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 idénticos.

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 receptor de IL-1 β utilizado de preferencia es el receptor de IL-1 β tipo 1. 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.

10 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.

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 ó 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*.

10 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 15 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 20 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 25 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 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 completas para la producción de un anticuerpo mediante técnicas de ADN recombinante, dada solamente la información escrita con
5 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
10 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
15 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
20 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
25 pesada 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 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 ADNc (sin intrones).

La segunda construcción de ADN codifica una cadena
5 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
10 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
15 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.

20 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
25 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 la posición 321. También de preferencia, la segunda parte codifica la parte constante de una cadena ligera humana, más
5 preferiblemente la parte constante de la cadena humana.

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
10 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
15 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
20 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
25 convenientemente de origen humano.

Cada una de las construcciones de ADN se coloca bajo el control de secuencias de control adecuadas, en particular 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, o un promotor de citomegalovirus (CMV), por ejemplo un promotor de CMV humano.

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.

Luego se transfiere cada vector de expresión que
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
de gen dhfr/metotrexato o equivalente. Los sistemas preferidos
5 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. De preferencia también el
10 vector puede contener otras secuencias, según se desee, para
facilitar la expresión, el procesamiento, y la exportación de
la proteína expresada; por ejemplo, el vector puede contener
normalmente una secuencia líder asociada con la secuencia
codificante.

15 En un aspecto adicional de la invención, se
proporciona B7un 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
20 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
25 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 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 B8un 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
5 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
10 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;

15 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
20 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
25 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.

10 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.

25 Los anticuerpos que tienen especificidad de enlace

para el epítopo 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
5 como los Anticuerpos de la Invención. Los Anticuerpos de la Invención de preferencia son los anticuerpos que tienen especificidad de enlace para este epítopo de IL-1 β humana cuando la IL-1 β humana está bajo condiciones fisiológicas nativas, por ejemplo normales, y no bajo condiciones
10 desnaturalizadas, por ejemplo no en la presencia de un agente 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
15 25, y que sean muy similares al epítopo 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*, o la IL-1 de mono tití.

De preferencia, los Anticuerpos de la Invención son
20 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.

25 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.

10 El potencial para neutralizar la señalización celular 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

15

20

25

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.

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 0.1 a aproximadamente 1 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:

5 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
10 severas, y rechazo de trasplante de órganos o tejidos.

Por ejemplo, los Anticuerpos de la Invención pueden 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
15 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
20 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
25 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 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
5 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,
10 o disfunción de órganos, especialmente caquexia relacionada con SIDA, por ejemplo asociada con, o a consecuencia de, infección por VIH.

Los Anticuerpos de la Invención son particularmente útiles para el tratamiento de enfermedades del metabolismo
15 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.

Los Anticuerpos de la Invención se pueden utilizar
20 para el tratamiento de cánceres, en particular tumores dependientes de IL-1.

Para estas indicaciones, la dosificación apropiada, por supuesto, variará dependiendo, por ejemplo, del Anticuerpo de la Invención particular que se vaya a emplear, del
25 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 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, por ejemplo infusión intravenosa, en lugar de hacerlo como una inyección de bolo, por ejemplo una inyección de bolo subcutánea, 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.

5 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
10 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
15 acción de AAL 160 en fiebre inducida por IL-1 β de rata.

EJEMPLOS

Se utilizan ratones transgénicos diseñados para
expresar el repertorio humano IgG/k en lugar del repertorio de
20 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 inmortalizan mediante tecnología de hibridoma convencional, y se obtienen células de hibridoma de murino que secretan el anticuerpo AAL 160 de
25 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
5 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
10 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,
15 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-1 β . Se identifican cinco anticuerpos monoclonales de la subclase IgG/k. La clonación se
20 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
25 monoclonales anti-IL-1 β mediante ELISA. Se preparan 1-2 litros

5

Secuenciación de Aminoácidos

SEQ ID NO:1

22 23 24 25
Gly pro tyr bla

150 CDR2 180
CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG 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
5 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

CDR3 330
AAC TGG GAT GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA
10 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

15 CDR1 90 120
CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC 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
22 23 24 25
Gly Pro Tyr Gly
30 40

150 CDR2 180
GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GCC
Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
20 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

5 Las secuencias de ADN que codifican para los dominios variables de cadena pesada y ligera, y las secuencias de aminoácidos correspondientes de AAL 160, también se dan en el listado de secuencias acompañante como las SEQ ID NOs:1 a 4.

10 Construcción de vectores de expresión para la cadena pesada y ligera

Las secuencias codificantes V_L y V_H clonadas se amplificaron mediante reacción en cadena de la polimerasa, y se insertaron por medio de sitios de restricción apropiados en
15 vectores de casete, proporcionando el promotor de inmunoglobulina, las secuencias líder a partir del anticuerpo RFT2 (Heinrich y colaboradores (1989) J. Immunol. 143, 3589-97), parte de los segmentos J, y un sitio donador de empalme.
El casete de cadena ligera que contenía la región V_L entera, el
20 promotor, y la secuencia líder para la secreción, se transfirió a un vector de expresión que contenía el gen Ck humano, el potenciador de cadena pesada de inmunoglobulina, y el ADNc de dhfr de murino modificado para selección mediante metotrexato (MTX).

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

5 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.

10 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
15 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
20 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
25 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 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) x 10 ⁵	Promedio + SEM
Constante de índice de disociación (s ⁻¹)	(n=15)	(1.53 $\pm$ 0.05) x 10 ⁴	Promedio + SEM
Constante de equilibrio de disociación K _D [M]	(n=15)	(396.6 $\pm$ 19.5) x 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

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

5 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

10 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.

15 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

20 *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 $\pm$ SEM
IL-1 β humana	100
IL-1 α humana	0.7 $\pm$ 0.7 (n=3)
IL-1Ra humana	1.2 $\pm$ 1.2 (n=3)
IL-1 β de ratón	2.8 $\pm$ 1.5 (n=3)
IL-1 β de rata	3.0 $\pm$ 2.5 (n=3)
IL-1 β de <i>Cynomolgus</i>	96.4 $\pm$ 6.8 (n=3)
IL-1 β de conejo	12.1 $\pm$ 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 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-1 β , a AAL 160, en un modelo de rata, en donde se induce 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
5 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:

○ 10 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
15 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
20 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 complejo con IL-1 β

Determinación de la estructura del Fab AAL160 en una resolución de 2.0Å:

- 5 Se recopiló un conjunto de datos de una resolución de 2.0Å de muy buena calidad ($R_{\text{sin}} = 0.051$, 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
- 10 M. El cristal estaba en el grupo de espacio $P2_12_12_1$ con dimensiones de células unitarias $a=62.17\text{Å}$, $b=89.83\text{Å}$, $c=123.73\text{Å}$, y una molécula de Fab por unidad simétrica (coeficiente de Matthews: $3.6 \text{ Å}^3/\text{Da}$, contenido de solvente estimado: 66 por ciento). La estructura se determinó mediante reemplazo
- 15 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
- 20 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 mal 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.
- 25 Cristalización del complejo Fab con IL-1 β y modelo

experimental preliminar del complejo: se obtuvieron unos 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 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
5 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
10 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.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novartis AG

<120> ANTICUERPOS PARA IL-1 BETA HUMANA

<130> 4-31289A

<160> 4

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 354

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (354)

<400> 1

gag gtg cag ctg gtg cag tct gga gca gag gtg aaa aag ccc ggg gag 48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

tct ctg aag atc tcc tgt aag ggt tct gga tac agc ttt acc agc tac 96
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

tgg atc ggc tgg gtg cgc cag atg ccc ggg aaa ggc ctg gag tgg atg 144
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

ggg atc atc tat cct agt gac tct gat acc aga tac agc cgg tcc ttc 192
Gly Ile Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

caa ggc cag gtc acc atc tca gcc gac aag tcc atc agc acc gcc tac 240
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

ctg cag tgg agc agc ctg aag gcc tcg gac acc gcc atg tat tac tgt 288
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aga tat acc aac tgg gat gct ttt gat atc tgg ggc caa ggg aca 336
Ala Arg Tyr Thr Asn Trp Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

atg gtc acc gtc tct tca 354
Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 2
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Tyr Thr Asn Trp Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 3
<211> 321
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (321)

<400> 3

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc ctt gag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg atg ttc 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Met Phe
 85 90 95

cct ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 321
 Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 4
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Met Phe
 85 90 95

Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

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;

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 molécula de enlace de IL-1 β de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para utilizarse para

el tratamiento de una enfermedad o desorden mediado por IL-1.

7. 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 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.

8. 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

CDR3'
CDR1'
CDR2' } No están la secuencia 2 sino en la 3.

Pesada

ligera...

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.

ligero

9. 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 7 o con la reivindicación 8.

10. 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 9, y (ii) recuperar la molécula de enlace de IL-1 β a partir del cultivo.

11. 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.

12. 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

que 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

no

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 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.

tratar

RESUMEN

5

Se proporciona una molécula de enlace de IL-1 β , en particular un anticuerpo para IL-1 β humana, especialmente un anticuerpo para IL-1 β humana, en donde las CDRs de las cadenas pesada y ligera tienen secuencias de aminoácidos como se definen, para utilizarse en el tratamiento de una enfermedad o desorden mediado por IL-1, por ejemplo osteoartritis, osteoporosis, y otros artrítidos inflamatorios.

15

* * * * *

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novartis AG

<120> ANTICUERPOS PARA IL-1 BETA HUMANA

<130> 4-31289A

<160> 4

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 354

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (354)

<400> 1

gag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	tct	gga	gca	gag	gtg	aaa	aag	ccc	ggg	gag	48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	
1				5					10					15		

tct	ctg	aag	atc	tcc	tgt	aag	ggt	tct	gga	tac	agc	ttt	acc	agc	tac	96
Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	<u>Ser</u>	<u>Tyr</u>	
			20				25						30			

tgg	atc	ggc	tgg	gtg	cgc	cag	atg	ccc	ggg	aaa	ggc	ctg	gag	tgg	atg	144
Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
<u>CDL1</u>	35					40					45					

ggg	atc	atc	tat	cct	agt	gac	tct	gat	acc	aga	tac	agc	ccg	tcc	ttc	192
Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ser	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe	
50						55			<u>CDL2</u>	60						

caa	ggc	cag	gtc	acc	atc	tca	gcc	gac	aag	tcc	atc	agc	acc	gcc	tac	240
Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65	3					70				75				80		

ctg	cag	tgg	agc	agc	ctg	aag	gcc	tgg	gac	acc	gcc	atg	tat	tac	tgt	288
Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
				85				90						95		

gcg	aga	tat	acc	aac	tgg	gat	gct	ttt	gat	atc	tgg	ggc	caa	ggg	aca	336
Ala	Arg	Tyr	Thr	Asn	Trp	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
			100		<u>CDL3</u>		105					110				

atg	gtc	acc	gtc	tct	tca											354
Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
			115													

Variable de cadena pesada

<210> 2

<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Tyr Thr Asn Trp Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

seq 2?

<210> 3
<211> 321
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

<400> 3
gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
CDR1'

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc ctt gag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg atg ttc 288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Met Phe
85 90 95

cct ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 321
Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 4
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Met Phe
85 90 95

Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

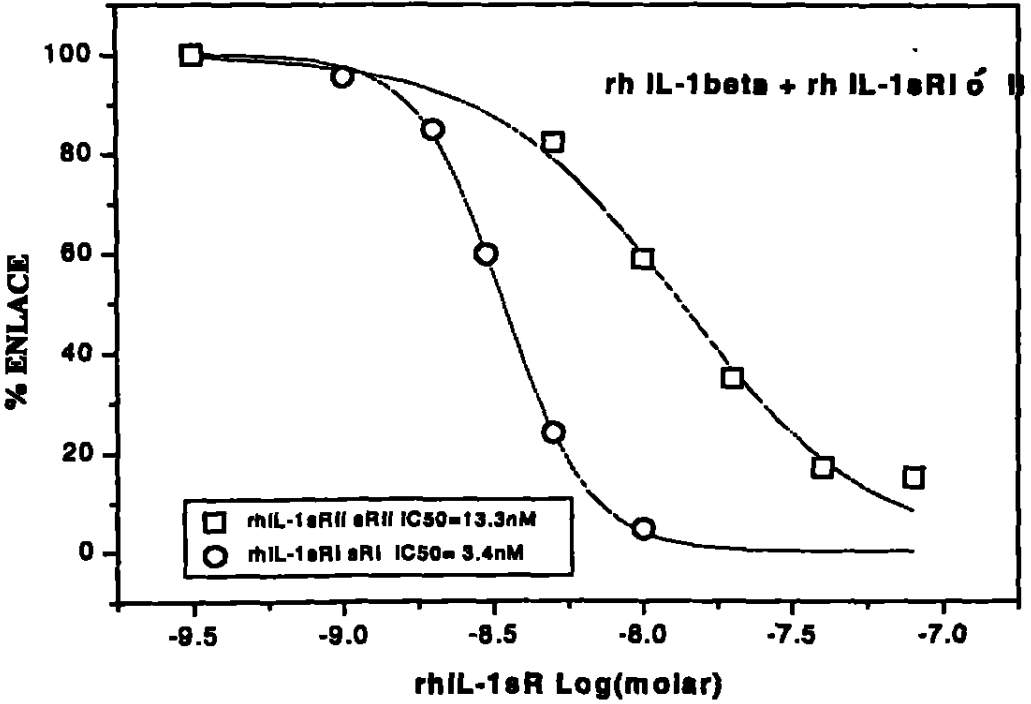


Figura 1

Figura 2

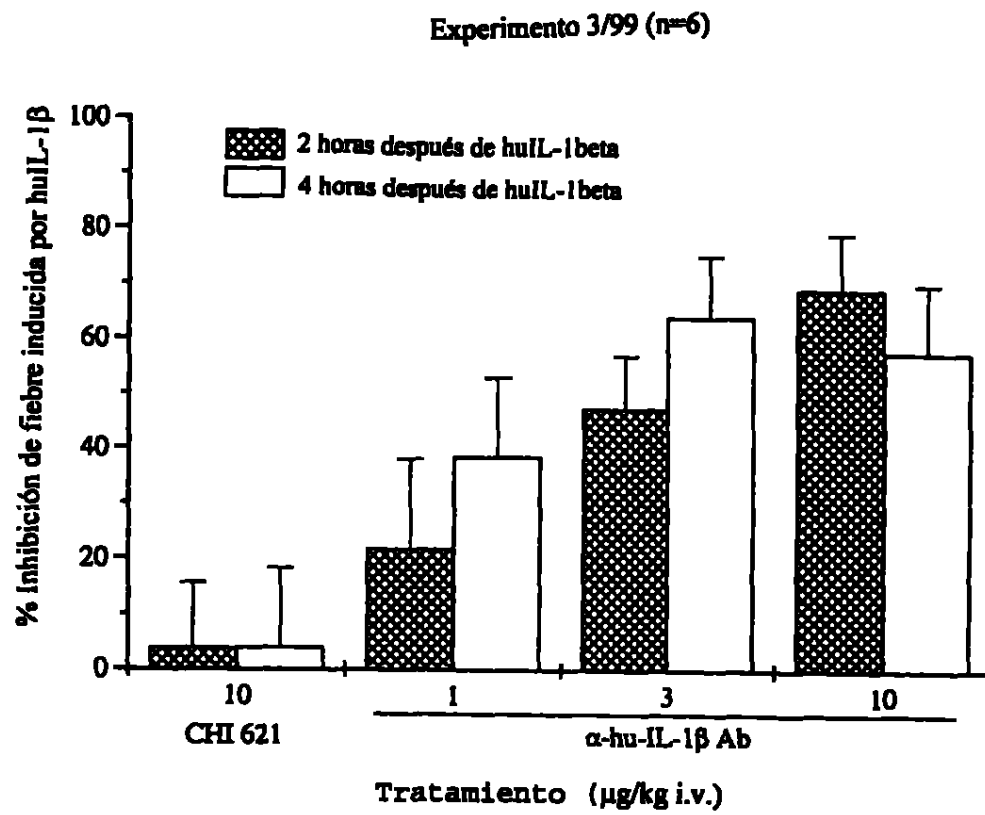
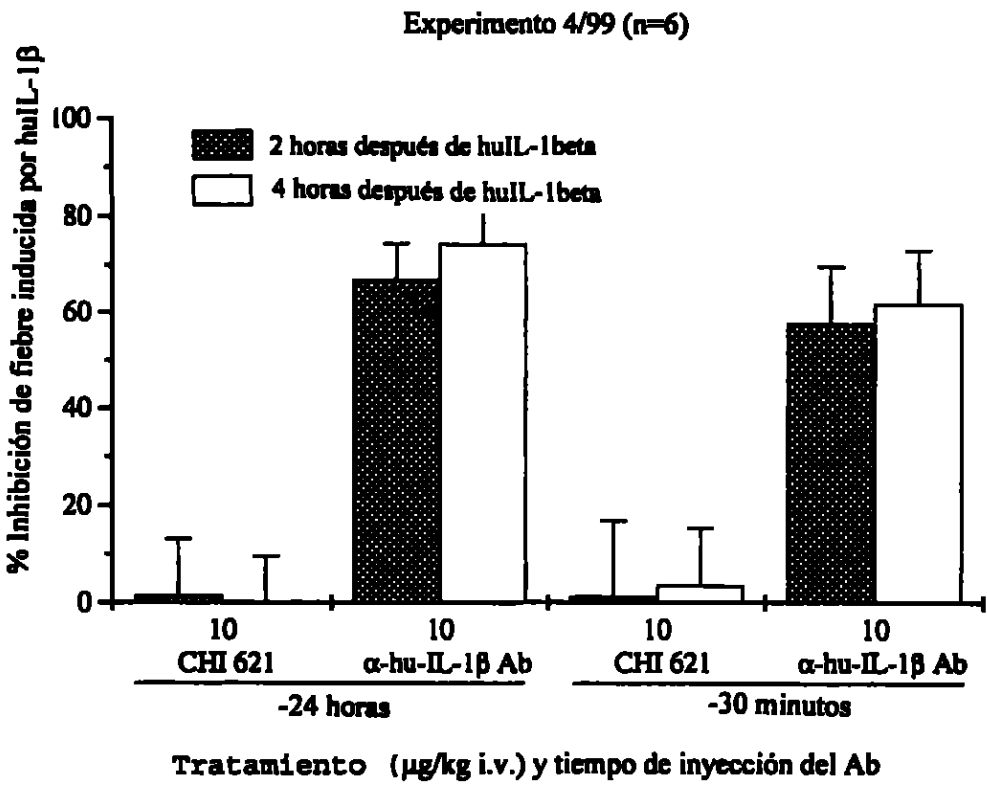


Figura 3



Folios 65 y 66
targetas

Q

folio 64 → Extracto para
publicación

01-11-2002

64
67

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 01003434 00000000

Folios: 66

Fecha (IMP): 2001-01-18 15:50:17

Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRADO/ 411 PRESENTM

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION [☒]

MODELO DE UTILIDAD [☐]

- o Indicación de que se solicita la concesión de una patente [☒]
- o Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [☒]
- o Descripción de la invención [☒]
- o Dibujos de ser estos pertinentes [☒]
- o Comprobante de Pago de las tasas establecidas [☒]

COMPLETA [☒]

INCOMPLETA [☐]

DISEÑO INDUSTRIAL [☐]

- o Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial. [☐]
- o Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. [☐]
- o Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño. [☐]
- o Comprobante de pago de las tasas establecidas. [☐]

COMPLETA [☐]

INCOMPLETA [☐]

ESQUEMA DE TRAZADO [☐]

- o Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado. [☐]
- o Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. [☐]
- o Representación gráfica del esquema de trazado [☐]
- o Comprobante de pago de las tasas establecidas. [☐]

COMPLETA [☐]

INCOMPLETA [☐]


Firma Responsable

Fecha: _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@ic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia



648
65

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

INFORME DE PROTOCOLO

Expediente 01-3434.

Fecha: 27 de Marzo del 2001.

Se certifica que:

Desde fecha 16 de Abril de 1997,
del folio 90.643 al folio 90.650
del libro de Protocolo N° 311, obra el
poder N° 17398 conferido por NOVARTIS AG
(NOVARTIS SA) (NOVARTIS INC)
domiciliado(a) en Basilea, Suiza.
al doctor Jimena Escobar Uribe y/o Ignacio
Escobar Uribe.

Facultad para desistir y sustituir si.

Revisado 202022.

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 382 2695
E-mail: Info@sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia



66 ⁶⁹

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

2020
Bogotá, D.C.

Doctora
JIMENA ESCOBAR URIBE
Apoderada

REFERENCIA:	Radicación No.	01-3434
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio No.	0958
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Debe allegar copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por el inventor al solicitante o a su causante (art. 26-k, Dec 486/2000).

- El interesado debe informar la dirección del solicitante, debido a que en la solicitud no aparece la misma. (Art. 27-b, D 486/00).

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el artículo 8 de la Resolución Reglamentaria No. 210 del 15 de enero del 2001.

ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

20 MAR. 2001

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____

Se recuerda al interesado que debe presentar, dentro de los dieciséis meses siguientes contados a partir de la fecha de presentación de la solicitud cuya prioridad se invoca, copia de la misma certificada por la autoridad que la expidió, un certificado de la fecha de presentación y, en los casos en que haya lugar, la traducción simple del capítulo reivindicatorio. El incumplimiento de este plazo, acarreará la pérdida de la prioridad invocada.

202027/202022

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 382 2695
E-mail: info@sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

~~29/03/2007~~

Q

Q