

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-203019- -00000-0000

Fecha: 2013-08-27 16:17:08

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 379 FASENACIONALII

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 4

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO **"TRATAMIENTO DE LA OSTEOARTRITIS Y DEL DOLOR".**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **A61K 39/395**

71. SOLICITANTE **ABBVIE, INC.**

DOMICILIO **NORTH CHICAGO, ESTADO DE ILLINOIS,**
ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA.

74. REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
T.P. 53.215

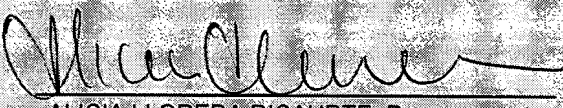
22. BOGOTÁ, D.C. **27 AGO 2013**

(FORMA P 10)

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-203019- -00000-0000 Fecha: 2013-08-27 16:17:08 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 379 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 4	de radicación
--	--	---------------

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☐ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☒ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2012/024356	Fecha 08/02/12
Publicación Internacional No.		WO 2012/109373 A3	Fecha 16/08/12
3	(54) TÍTULO DE LA INVENCIÓN:		
"TRATAMIENTO DE LA OSTEOARTRITIS Y DEL DOLOR"			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (51) CIP		
A61K39/395			
5	(71) SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
4. ABBVIE, INC.			
6. DATOS DEL SOLICITANTE			
DIRECCIÓN		1 North Waukegan Road North, Chicago, IL 60064, Estados Unidos de América.	No. TELÉFONO 3264270
CIUDAD		North Chicago	E-MAIL notificacionespatentes@lloredacamacho.com
DEPARTAMENTO/ESTADO		Illinois	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN Estado de Delaware, Estados Unidos de América.
PAÍS DE RESIDENCIA		Estados Unidos de América.	
7	(72) INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. KAMATH		Rajesh, V.	India
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO: notificacionespatentes@lloredacamacho.com			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
Estados Unidos de América	Massachusetts	Shrewsbury	27 Redland Street, Shrewsbury, MA 01545, Estados Unidos de América.
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	(74) ☒ REPRESENTANTE ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
LLOREDA RICAURTE		ALICIA	C.C 39.690.713 T.P. 53.215
DIRECCIÓN	Calle 72 No 5-83 Piso 5to	No. TELÉFONO	3264270
CIUDAD	Bogotá	E-MAIL	notificacionespatentes@lloredacamacho.com
PAÍS	Colombia	No. DE PROTOCOLO EN LA OFICINA	

10	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. Estados Unidos de América		US	61/440,853	11/02/08
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.				
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
13	REDUCCIÓN DE TASAS			
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas		Universidades públicas o privadas	Entidades sin ánimo de lucro	
☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación. Acreditación Colciencias.	☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.			☐ Hoja de información complementaria.	
			☐ Otros, especificar	
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO			
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de Internet.				
14	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 13-0067449	Fecha 08-07-2013	
15	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL			
<i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio).</i>				
 ALICIA LLOREDA RICAURTE Representante C.C. 39.690.713 T.P.53.215 Apoderado				
16	ORDEN Y RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD			
Documentación Técnica		Documentación Jurídica		
Solicitud Internacional en castellano				
1. ☒ Descripción N° de folios: 246		9. ☒ Poderes, si fuera el caso.		
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 35		10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.		
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 13		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal, cuando el solicitante es persona jurídica.		
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.		
7. ☐ Arte final 12 x 12.		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.		
8. ☒ Anexo formato digital.		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.		
		17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.		

•

VER ANEXO CD

•

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0067449
		Bogotá D.C., Julio 08 de 2013 - 16:45:29

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.					NI 830.022.145
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	561170293	08/07/2013	8.680.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				<u>\$500.000.00</u>

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
--
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-203019- -00000-0000
Fecha: 2013-08-27 16:17:08 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4



No. 13-203019- -00000-0000

Fecha: 2013-08-27 16:17:08 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4



LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE - NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

TRATAMIENTO DE LA OSTEOARTRITIS Y DEL DOLOR

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

Tratamiento de la osteoartritis y del dolor usando proteínas de unión a IL-1 α e IL-1 β , incluyendo anticuerpos anti-IL-1 α y anti-IL-1 β y proteínas de unión IL-1 α e IL-1 β manipuladas multivalentes y de especificidad múltiple.

SECTOR: Preparaciones que comprenden proteínas de unión a IL-1 α e IL-1 β , incluyendo anticuerpos anti-IL-1 α y anti-IL-1 β y proteínas de unión IL-1 α e IL-1 β manipuladas multivalentes y de especificidad múltiple útiles en el tratamiento de tratar la osteoartritis (OA) y para tratar el dolor.

TRATAMIENTO DE LA OSTEOARTRITIS Y DEL DOLOR

Referencia a una solicitud relacionada

Esta solicitud invoca el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de Patente de los EE.UU. N° 61/440.853, presentada el 8 de febrero, 2011; cuyo contenido completo se incorpora en la presente a modo de referencia.

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con el tratamiento de la osteoartritis y del dolor, y más específicamente con el uso de proteínas que se unen a la IL-1 α y/o a la IL-1 β para tratar la osteoartritis y el dolor.

Antecedentes de la invención

El cartílago de las articulaciones, o "cartílago hialino", de vertebrados saludables (incluyendo seres humanos y otros mamíferos) es un tejido conectivo opalescente semitransparente, caracterizado por un patrón de crecimiento columnar de condrocitos en una matriz extracelular (ECM) compuesta predominantemente por proteoglucanos, colágeno tipo II y agua. El cartílago de las articulaciones actúa como un amortiguador eficaz para soportar el peso y prevenir el contacto entre huesos opuestos en una articulación, por lo cual resulta crítico para el funcionamiento normal de las articulaciones. El cartílago de las articulaciones no sólo es susceptible a daños por traumatismos de las articulaciones, sino también a un proceso de erosión gradual. Inicialmente, dicha erosión puede ser simplemente un "defecto parcial del espesor" asintomático, en

donde un área de cartílago hialino reducido no penetra por completo hasta el hueso subcondral. Habitualmente, dichos defectos parciales del espesor no son dolorosos y típicamente sólo se detectan durante un examen artroscópico. Sin embargo, si el proceso erosivo no es tratado, la base del defecto parcial del espesor puede continuar desgastándose y puede aumentar el diámetro del defecto de manera tal que el defecto finalmente progresa en un "defecto de espesor completo" que penetra en el hueso subyacente. Tales defectos de espesor completo se pueden volver suficientemente grandes como para que las superficies de los huesos opuestos de una articulación hagan contacto y comiencen a erosionarse entre sí, lo cual conduce a inflamación, dolor y otros cambios degenerativos, es decir, los síntomas clásicos de una osteoartritis (OA). La osteoartritis es entonces una enfermedad degenerativa, progresiva e incapacitante que da como resultado deformación, inestabilidad, discapacidad y dolor de la articulación. Finalmente, una cirugía de reemplazo de la articulación puede ser el único recurso práctico para restablecer, al menos en parte, un cierto nivel de movilidad en un individuo.

La superfamilia de la IL-1 está compuesta por mediadores de los procesos inflamatorios con un amplio rango de efectos biológicos y fisiológicos, incluyendo fiebre, síntesis de prostaglandinas (por ejemplo, en fibroblastos, células musculares y células endoteliales), activación de linfocitos T y producción de interleuquina-2. Los miembros originales de la superfamilia de IL-1 son IL-1 α , IL-1 β y el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra, IL-1RA, IL-1ra, IL-1R α). Ambas IL-1 α e IL-1 β son citoquinas pro-inflamatorias involucradas en la defensa inmune

contra infecciones. El IL-1R α compite por la unión al receptor con la IL-1 α y la IL-1 β , bloqueando así su rol en la activación inmune. Otros miembros de la superfamilia de la IL-1 incluyen IL-18 (véase Dinarello (1994) *FASEB J.* 8(15): 1314-1325; Huising et al., (2004) *Dev. Comp. Immunol.*, 28(5): 395-413) y seis genes adicionales que presentan homología estructural con IL-1 α , IL-1 β o IL-1RA, denominados IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, IL1F9 y IL1F10. En concordancia, la IL-1 α , la IL-1 β y la IL-1RA fueron renombradas como IL-1F1, IL-1F2 e IL-1F3, respectivamente (véase Sims et al., (2001) *Trends Immunol.*, 22(10): 536–537; Dunn et al., (2001) *Trends Immunol.*, 22(10): 533-536). Se ha descrito un miembro putativo adicional de la familia de la IL-1 denominada IL-33 o IL-1F11, aunque este nombre no está aceptado oficialmente en la base de datos de nomenclatura de la familia de genes HGNC.

Tanto la IL-1 α como la IL-1 β son producidas por macrófagos, monocitos y células dendríticas. Constituyen una parte importante de la respuesta inflamatoria del cuerpo contra una infección. Estas citoquinas incrementan la expresión de los factores de adhesión sobre las células endoteliales para permitir la trans migración de leucocitos hacia los sitios de infección y vuelven a definir el centro termorregulador del hipotálamo, lo cual conduce a una mayor temperatura corporal que se expresa en la forma de fiebre. Por ello a la IL-1 se la conoce como pirógeno endógeno. El incremento de la temperatura corporal le ayuda al sistema inmune del cuerpo a luchar contra la infección. La IL-1 también es importante en la regulación de la hematopoyesis. La producción de IL-1 β en tejidos periféricos también se ha asociado con la hiperalgesia (mayor sensibilidad

al dolor) asociada con fiebre (Morgan et al., (2004) *Brain Res.*, 1022(1-2): 96-100). La IL-1 sobrerregula la expresión de la ciclooxygenasa-2 (COX-2) asociada con el dolor. En general, la IL-1 α y la IL-1 β se unen al mismo receptor celular. Este receptor está compuesto por dos subunidades relacionadas, pero no idénticas, que transmiten señales intracelulares a través de una vía que es compartida en gran parte con algunos otros receptores. Estos incluyen la familia Toll de receptores inmunes innatos y el receptor de la IL-18. La IL-1 α y la IL-1 β también presentan propiedades biológicas similares, incluyendo inducción de fiebre, sueño de ondas lentas y neutro filia, activación de linfocitos T y B, proliferación de fibroblastos, citotoxicidad para determinadas células, inducción de colagenasas, síntesis de proteínas hepáticas de fase aguda y mayor producción de factores estimulantes de colonias y colágeno.

Se han aislado y expresado los ADNc que codifican a la IL-1 α y a la IL-1 β ; estos ADNc representan dos productos genéticos diferentes, denominados IL-1 α (Lomedico et al., (1984) *Nature* 312: 458) e IL-1 β (Auron et al., (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7909). Ocho genes de la familia de la interleuquina 1 forman una agrupación de genes de citoquinas en el cromosoma 2. La IL-1 β es la forma predominante producida por los monocitos humanos tanto a nivel de ARNm como proteico. Las dos formas de la IL-1 humana solamente comparten un 26% de homología de aminoácidos. A pesar de las distintas secuencias de polipéptidos, las dos formas de la IL-1 tienen similitudes estructurales (Auron et al., (1985) *J. Mol. Cell Immunol.*, 2: 169), por cuanto la homología de aminoácidos está confinada a regiones discretas de la molécula de IL-1.

La IL-1 α y la IL-1 β se producen como péptidos precursores. En otras palabras, son elaboradas como una proteína larga que luego es procesada para liberar una molécula activa, más corta, denominada proteína madura. La IL-1 α es producida como una proproteína que es procesada proteolíticamente por la calpaína y liberada mediante un mecanismo que aún no está bien estudiado. La IL-1 β madura, por ejemplo, es liberada de la Pro-IL-1 β después del clivaje por un miembro determinado de la familia de proteínas caspasa, denominada caspasa-1 o la enzima convertidora de interleuquina-1 (ICE). La estructura tridimensional de las formas maduras de cada miembro de la superfamilia de IL-1 humana está compuesta por 12-14 cadenas β que producen una proteína con forma de barril.

La IL-1 α se denominó originalmente "catabolina" debido a su efecto para incrementar la resorción de cartílago, pero también era conocida como "factor celular de monocitos" (MCF) debido a su efecto estimulante sobre la colagenasa y las prostaglandinas en las células sinoviales, y como "factor endógeno de leucocitos" (LEM) con un efecto estimulante sobre las reacciones de fase aguda. La IL-1 α tiene un amplio espectro de actividades biológicas, dado que la IL-1 α es sintetizada por muchas células diferentes, tales como monocitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y linfocitos, y muchas células poseen receptores específicos para la IL-1 α . La IL-1 α estimula la proliferación de timocitos por inducción de la liberación de IL-2, la maduración y la proliferación de células B y la actividad del factor de crecimiento de fibroblastos. Las proteínas IL-1 α fueron identificadas como pirógenos endógenos y se informa que estimulan la liberación de prostaglandina y colagenasa de células sinoviales. Por consiguiente, la IL-1 α

ocupa una posición central como disparador de diversos trastornos y síntomas de trastornos. A menudo se observa que estos trastornos son predominantemente trastornos severos para los cuales hay poco o ningún tratamiento. Se ha sugerido que el polimorfismo de estos genes está asociado con la artritis reumatoide y el mal de Alzheimer. En general, la IL-1 se ha relacionado con muchas enfermedades en humanos, incluyendo artritis, fibrosis pulmonar, enfermedades del sistema nervioso central, diabetes mellitus y determinadas enfermedades cardiovasculares. Los efectos indeseables de la IL-1 α se describen, por ejemplo, en Oppenheim et al., (1986) *Immunol. Today* 7: 45-56, Durum et al., (1985) *Ann. Rev. Immunol.*, 3: 263-287 y Symons et al., (1989) *Lymphokine Res.*, 8: 365-372.

El inicio, el mantenimiento y la progresión de la OA están mediados por una cascada compleja de vías mecánicas y bioquímicas en donde la IL-1 cumple un rol fundamental. La IL-1 α y la IL-1 β no sólo se producen en monocitos, macrófagos y neutrófilos, sino también en las células presentes en los tejidos articulares, tales como condrocitos, fibroblastos sinoviales y osteoclastos (véase, por ejemplo, Dinarello et al., (2009) *Ann. Rev. Immunol.*, 27: 519-550). La IL-1 puede estimular a los condrocitos y sinoviocitos in vitro, para producir las proteinasas relacionadas con la destrucción del cartílago que conduce a la OA (véase, por ejemplo, Dayer et al., (1977) *Science* 195: 181-183; Dayer et al., (1984) *Biochem. Pharmacol.*, 33: 2893-2899; McGuire-Goldring et al., (1984) *Arthritis Rheum.*, 27: 654-662), así como para inhibir la síntesis de proteoglicano y colágeno tipo II, que son los componentes principales de la matriz extracelular (ECM) del cartílago hialino normal (véase, por ejemplo, Goldring et al., (1987) *J.*

Biol. Chem. 262: 16724-16729; Goldring et al., (1988) *J. Clin. Investig.* 82: 2026-2037). Estudios preclínicos y clínicos han proporcionado evidencia adicional de la IL-1 en la patogénesis de la OA. Por ejemplo, la inyección intra-articular (ia) de IL-1 en la rodilla de animales dio como resultado la infiltración de leucocitos y la pérdida de cartílago (Pettiphar et al., (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8749-8753). Por el contrario, la inyección de un antagonista de la IL-1 dio como resultado una reducción significativa del avance de la OA experimental (véase, por ejemplo, Pelletier et al., (1997) *Arthritis Rheum.*, 40: 1012-1019; Caron et al., (1996) *Arthritis Rheum.*, 39: 1535-1544); Fernandes et al., (1999) *Am. J. Pathol.*, 154: 11590-11690); Zhang et al., (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 341: 202-208). Además, se encontró que los ratones noqueados (KO) para la IL-1 eran resistentes al daño del cartílago inducido quirúrgicamente cuando se comparaban con sus contrapartes de tipo salvaje (Glasson et al., (2009) *Osteoarthritis Cartilage*, 18: 572-580).

Ambas IL-1 α e IL-1 β se expresan en las membranas sinoviales, el cartílago y el líquido sinovial de pacientes humanos con OA (véase, por ejemplo, Farahat et al., (1993) *Ann. Rheum. Dis.* 52: 870-875). El antagonista de la IL-1, Anakinra, que es un antagonista del receptor de IL-1, y AMG-108, que es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-1, presentaron una cierta eficacia en ensayos de OA con respecto a los síntomas y a la condroprotección ("Results from a Randomized Controlled Trial of AMG 108 (a fully human monoclonal antibody to IL-1R type I) in Patients With Osteoarthritis of the Knee", Cohen et al., ACR2007). Estas dos terapias propuestas serán sometidas a estudios adicionales para poder

demostrar una eficacia clínica clara y fuerte.

Persiste la necesidad de métodos y composiciones nuevas y efectivos para tratar a individuos que sufren de osteoartritis.

Resumen de la invención

La invención provee métodos para tratar la osteoartritis (OA) y para tratar el dolor. Dichos métodos comprenden administrar a un individuo (humano u otro mamífero) una o más proteínas de unión que se unen a la IL-1 α y a la IL-1 β .

En un aspecto de la invención, un método para tratar la osteoartritis en un individuo (humano u otro mamífero) comprende el paso de administrar al individuo una proteína de unión que se une a la IL-1 α en combinación (por ejemplo, en una mezcla, por administración sucesiva o por administración concurrente) con una proteína de unión que se une a la IL-1 β o administrar al individuo una proteína de unión que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β .

En una forma de realización, un método para tratar la osteoartritis en un individuo comprende administrar al individuo una proteína de unión que se une a la IL-1 α , en donde la proteína de unión es un anticuerpo contra la IL-1 α , por ejemplo, un anticuerpo monoclonal contra la IL-1 α . En otra forma de realización, un método para tratar la osteoartritis en un individuo comprende administrar al individuo una proteína de unión que se une a la IL-1 β , en donde la proteína de unión es un anticuerpo que se une a la IL-1 β , por ejemplo, un anticuerpo monoclonal que se une a la IL-1 β .

En otro aspecto de la invención, un método de tratamiento de la osteoartritis en un individuo (humano u otro mamífero) comprende el paso de

administrar al individuo una proteína de unión que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β . Preferiblemente, la proteína de unión es una proteína de unión del dominio variable dual de inmunoglobulina (también denominada "DVD-Ig™" o proteína de unión o molécula "DVD-Ig" en la presente) que comprende al menos un sitio de unión que se une a la IL-1 α y al menos un sitio de unión que se une a la IL-1 β . Más preferiblemente, la proteína de unión DVD-Ig comprende dos sitios de unión que se unen a la IL-1 α y dos sitios de unión que se unen a la IL-1 β .

En otra forma de realización, un método de acuerdo con la invención para tratar osteoartritis en un individuo comprende administrar al individuo una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión que se une a la IL-1 α , una proteína de unión que se une a la IL-1 β , una combinación de una proteína de unión que se une a la IL-1 α y una proteína de unión que se une a la IL-1 β , o una proteína de unión que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β ; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una forma de realización de la invención, un método para tratar la osteoartritis comprende administrar a un individuo una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 α y una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 β , o una proteína de unión cristalizada que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β . Dichas proteínas de unión cristalizadas de utilidad en la invención incluyen, pero en un sentido no taxativo, un anticuerpo cristalizado contra la IL-1 α , un anticuerpo cristalizado contra la IL-1 β y una proteína de unión DVD-Ig cristalizada que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β .

Las composiciones que son de utilidad en los métodos de la invención para

tratar la osteoartritis en un individuo incluyen una composición para la liberación de una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 α , una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 β , una combinación de una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 α y una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 β , o una proteína de unión cristalizada que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β .

En una forma de realización, una composición que es de utilidad en un método para tratar la osteoartritis de acuerdo con la invención comprende:

(a) una formulación, en donde dicha formulación comprende una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 α , una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 β , una combinación de una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 α y una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 β , o una proteína de unión cristalizada que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β ; y, opcionalmente, un ingrediente; y

(b) al menos un vehículo polimérico.

En una forma de realización, una composición descrita previamente comprende una combinación de una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 α y una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 β . En otra forma de realización, la proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 α es un anticuerpo cristalizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal cristalizado que se une a la IL-1 α y la proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 β es un anticuerpo cristalizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal que se une a la IL-1 β .

En una forma de realización, una composición descrita previamente

comprende una proteína de unión cristalizada que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β . En otra forma de realización, la proteína de unión cristalizada es una proteína de unión cristalizada de un dominio variable dual (DVD-Ig) que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β -Ig.

En otra forma de realización, un método para tratar la osteoartritis en un individuo comprende administrar al individuo una composición que comprende una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 α , una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 β , una combinación de ambas proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 α y proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 β , o una proteína de unión cristalizada que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β ; en donde dicho al menos un vehículo polimérico es un polímero seleccionado entre uno o más del grupo que consiste en ácido poli (acrílico), poli(cianoacrilatos), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(depsipéptido), poli (ésteres), ácido poli(láctico), ácido poli (láctico-co-glicólico) o PLGA, poli(b-hidroxibutirato), poli(caprolactona), poli(dioxanona); poli(etilenglicol), poli((hidroxipropil)metacrilamida, poli[(órgano)fosfazeno], poli(orto-ésteres), alcohol poli(vinílico), poli(vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maleico-alquil vinil éter, polioles plurónicos, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glucaminoglucanos, polisacáridos sulfatados, mezclas y copolímeros de los mismos.

En una forma de realización, cuando el ingrediente opcional está presente en una composición descrita previamente, dicho ingrediente se selecciona del grupo que consiste en albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina,

hidroxipropil- β -ciclodextrina, metoxipolietilenglicol y polietilenglicol.

En una forma de realización, un método para tratar la osteoartritis descrito previamente comprende además administrar al individuo un segundo agente, en donde dicho segundo agente provee una propiedad adicional deseable al método o composición usado en el método. Dicho segundo agente adicional puede comprender una o más moléculas del grupo que consiste en budenosida, factor de crecimiento epidérmico, corticosteroides, ciclosporina, sulfasalazina, aminosalicilatos, 6-mercaptopurina, azatioprina, metronidazol, inhibidores de lipoxigenasa, mesalamina, olsalazina, balsalazida, antioxidantes, inhibidores de tromboxano, antagonistas del receptor de IL-1, anticuerpos monoclonales anti-IL-1 β , anticuerpos monoclonales anti-IL-6, factores de crecimiento, inhibidores de elastasa, compuestos de piridinil-imidazol, anticuerpos de TNF, LT, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-23, EMAP-II, GM-CSF, FGF y PDGF, anticuerpos de CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos, metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetilo, leflunomida, una NSAID, ibuprofeno, corticosteroides, prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, IRAK, NIK, IKK, p38, inhibidores de MAP quinasa, inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 β , inhibidores de la enzima convertidora de TNF α , inhibidores de la señalización de células T, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores solubles de citoquinas, receptor soluble de p55 TNF, sIL-1RI, sIL-1RII,

sIL-6R, citoquinas antiinflamatorias, IL-4, IL-10, IL-11, IL-11, IL-13 y TGF β .

En otro aspecto de la invención, un método de tratamiento de osteoartritis descrito en la presente comprende administrar a un individuo una o más proteínas de unión descritas en la presente o una composición descrita en la presente por medio de por lo menos un modo seleccionado entre parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intraventricular, intracerebeloso, intracerebroventricular, intracolónico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraóseo, intrapélvico, intrapericardíaco, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterino, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal y transdérmico.

En un aspecto de la invención, un método para tratar el dolor en un individuo (humano u otro mamífero) comprende el paso de administrar al individuo una proteína de unión que se une a la IL-1 α en combinación (por ejemplo, en una mezcla, por administración sucesiva o por administración concurrente) con una proteína de unión que se une a la IL-1 β o administrar al individuo una proteína de unión que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β .

Los métodos y las composiciones de acuerdo con la invención se pueden usar para tratar el dolor en un individuo que sufre de cualquier forma de dolor, incluyendo dolor por cáncer, dolor neuropático, dolor muscular, dolor de articulaciones, dolor por fractura de huesos, dolor por heridas, dolor por cirugía, cefalea, migraña, así como condiciones de dolor tales como alodinia (dolor

alodínico), hiperalgesia y una combinación de alodinia e hiperalgesia.

En una forma de realización, un método para tratar el dolor en un individuo comprende administrar al individuo una proteína de unión que se une a la IL-1 α , en donde la proteína de unión es un anticuerpo contra la IL-1 α , por ejemplo, un anticuerpo monoclonal contra la IL-1 α . En otra forma de realización, un método para tratar el dolor en un individuo comprende administrar al individuo una proteína de unión que se une a la IL-1 β , en donde la proteína de unión es un anticuerpo que se une a la IL-1 β , por ejemplo, un anticuerpo monoclonal que se une a la IL-1 β .

En otro aspecto de la invención, un método de tratamiento de dolor en un individuo comprende el paso de administrar al individuo una proteína de unión que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β . Preferiblemente, la proteína de unión es una proteína de unión del dominio variable dual de inmunoglobulina (también denominada "DVD-IgTM" o proteína de unión o molécula "DVD-Ig" en la presente) que comprende al menos un sitio de unión que se une a la IL-1 α y al menos un sitio de unión que se une a la IL-1 β . Preferiblemente, la proteína de unión DVD-Ig comprende dos sitios de unión que se unen a la IL-1 α y dos sitios de unión que se unen a la IL-1 β .

En otra forma de realización, un método de acuerdo con la invención para tratar el dolor en un individuo comprende administrar al individuo una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión que se une a la IL-1 α , una proteína de unión que se une a la IL-1 β , una combinación de una proteína de unión que se une a la IL-1 α y una proteína de unión que se une a la IL-1 β , o una

proteína de unión que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β ; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una forma de realización de la invención, un método para tratar el dolor comprende administrar a un individuo una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 α y una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 β , o una proteína de unión cristalizada que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β . Dichas proteínas de unión cristalizadas de utilidad en la invención incluyen, pero en un sentido no taxativo, un anticuerpo cristalizado contra la IL-1 α , un anticuerpo cristalizado contra la IL-1 β y una proteína de unión DVD-Ig cristalizada que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β .

Las composiciones que son de utilidad en los métodos de la invención para tratar el dolor en un individuo incluyen una composición para la liberación de una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 α , una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 β , una combinación de una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 α y una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 β , o una proteína de unión cristalizada que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β .

En una forma de realización, una composición que es de utilidad en un método para tratar el dolor de acuerdo con la invención comprende:

(a) una formulación, en donde dicha formulación comprende una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 α , una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 β , una combinación de una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 α y una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 β , o una proteína de unión cristalizada que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β ; y,

opcionalmente, un ingrediente; y

(b) al menos un vehículo polimérico.

En una forma de realización, una composición descrita previamente comprende una combinación de ambas proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 α y una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 β . En otra forma de realización, la proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 α es un anticuerpo cristalizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal cristalizado que se une a la IL-1 α y la proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 β es un anticuerpo cristalizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal que se une a la IL-1 β .

En una forma de realización, una composición descrita previamente comprende una proteína de unión cristalizada que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β . En otra forma de realización, la proteína de unión cristalizada es una proteína de unión cristalizada de un dominio variable dual (DVD-Ig) que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β -Ig.

En otra forma de realización, un método para tratar el dolor en un individuo comprende administrar al individuo una composición que comprende una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 α , una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 β , una combinación de una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 α y una proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 β , o una proteína de unión cristalizada que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β ; en donde dicho al menos un vehículo polimérico es un polímero seleccionado entre uno o más del grupo que consiste en ácido poli (acrílico), poli(cianoacrilatos), poli(aminoácidos),

poli(anhídridos), poli(depsipéptido), poli (ésteres), ácido poli(láctico), ácido poli (láctico-co-glicólico) o PLGA, poli(b-hidroxibutirato), poli(caprolactona), poli(dioxanona); poli(etilenglicol), poli((hidroxipropil)metacrilamida, poli[(órgano)fosfazeno], poli(orto-ésteres), alcohol poli(vinílico), poli(vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maleico-alquil vinil éter, polioles plurónicos, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glucaminoglucanos, polisacáridos sulfatados, mezclas y copolímeros de los mismos.

En una forma de realización, cuando el ingrediente opcional está presente en una composición descrita previamente, dicho ingrediente se selecciona del grupo que consiste en albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, metoxipolietilenglicol y polietilenglicol.

En una forma de realización, un método para tratar el dolor descrito previamente comprende además administrar al individuo un segundo agente, en donde dicho segundo agente provee una propiedad adicional deseable al método o composición usado en el método. Dicho segundo agente adicional puede comprender una o más moléculas del grupo que consiste en budenosida, factor de crecimiento epidérmico, corticosteroides, ciclosporina, sulfasalazina, aminosalicilatos, 6-mercaptopurina, azatioprina, metronidazol, inhibidores de lipoxigenasa, mesalamina, olsalazina, balsalazida, antioxidantes, inhibidores de tromboxano, antagonistas del receptor de IL-1, anticuerpos monoclonales anti-IL-1 β , anticuerpos monoclonales anti-IL-6, factores de crecimiento, inhibidores de elastasa, compuestos de piridinil-imidazol, anticuerpos de TNF, LT, IL-2, IL-6, IL-7,

IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-23, EMAP-II, GM-CSF, FGF y PDGF, anticuerpos de CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos, metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetilo, leflunomida, una NSAID, ibuprofeno, corticosteroides, prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, IRAK, NIK, IKK, p38, inhibidores de MAP quinasa, inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 β , inhibidores de la enzima convertidora de TNF α , inhibidores de la señalización de células T, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores solubles de citoquinas, receptor soluble de p55 TNF, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, citoquinas antiinflamatorias, IL-4, IL-10, IL-11, IL-11, IL-13 y TGF β .

En otro aspecto de la invención, un método de tratamiento de dolor descrito en la presente comprende administrar a un individuo una o más proteínas de unión descritas en la presente o una composición descrita en la presente por medio de por lo menos un modo seleccionado entre parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intraventricular, intracerebeloso, intracerebroventricular, intracolónico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraóseo, intrapélvico, intrapericardíaco, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterino, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal y transdérmico.

En otra forma de realización, la invención provee un método de tratamiento de dolor en un individuo que sufre de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión de IL-1. Dicha expresión de IL-1 en el individuo puede dar como resultado niveles aumentados de IL-1 en el plasma y/o un tejido local del individuo.

En una forma de realización, los métodos y las composiciones que se describen en la presente se usan para tratar el dolor en un individuo que sufre de una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que comprende osteoartritis, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, artritis séptica, artritis de Lyme, artritis psoriática, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de intestino inflamatoria, diabetes mellitus dependiente de insulina, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, dermatitis, escleroderma, enfermedad de injerto versus huésped, rechazo de transplante de órganos, enfermedad inmune aguda o crónica asociada con el transplante de órganos, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schoenlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis crónica activa, uveítis, shock séptico, síndrome de shock tóxico, síndrome de sepsis, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasitarias, mielitis transversa aguda, corea de Huntington, mal de Parkinson, mal de Alzheimer, accidente cerebrovascular, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, formas malignas, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio,

enfermedad de Addison, deficiencia poliglandular tipo I esporádica, deficiencia poliglandular tipo II (síndrome de Schmidt), síndrome de dificultad respiratoria de adultos (agudo), alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía psoriática, artropatía colítica ulcerosa, sinovitis enteropática, artropatía asociada con *Chlamydia*, artropatía asociada con *Yersinia*, artropatía asociada con *Salmonella*, espondiloartropatía, enfermedad ateromatosa/arterioesclerosis, alergia atópica, enfermedad bullosa autoinmune, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, penfigoide, enfermedad por IgA lineal, anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica Coombs positiva, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis miálgica/enfermedad *Royal Free*, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de células gigantes, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmune criptogénica, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, enfermedades relacionadas con la inmunodeficiencia adquirida, hepatitis B, hepatitis C, inmunodeficiencia común variada (hipogammaglobulinemia variable común), cardiomiopatía dilatada, esterilidad femenina, insuficiencia ovárica, insuficiencia ovárica prematura, enfermedad pulmonar fibrótica, alveolitis fibrosante criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial post-inflamatoria, pneumonitis intersticial, enfermedad pulmonar intersticial asociada con enfermedades del tejido conectivo, enfermedad pulmonar asociada con enfermedades del tejido conectivo mixtas, enfermedad pulmonar intersticial asociada con esclerosis sistémica, enfermedad pulmonar intersticial asociada con artritis reumática, enfermedad pulmonar asociada con lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar asociada con

dermatomiositis/polimiositis, enfermedad pulmonar asociada con la enfermedad de Sjogren, enfermedad pulmonar asociada con espondilitis anquilosante, enfermedad pulmonar difusa vasculítica, enfermedad pulmonar asociada con hemosiderosis, enfermedad pulmonar intersticial inducida por drogas, fibrosis, fibrosis por radiación, bronquiolitis obliterans, neumonía eosinofílica crónica, enfermedad pulmonar linfocítica infiltrante, enfermedad pulmonar intersticial postinfecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmune, hepatitis autoinmune tipo-1 (hepatitis autoinmune o lupoide clásica), hepatitis autoinmune tipo-2 (hepatitis por anticuerpo anti-LKM), hipoglucemia autoinmune, resistencia a insulina tipo B con acantosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad inmune aguda asociada con el transplante de órganos, enfermedad inmune crónica asociada con el transplante de órganos, osteoartrosis, colangitis esclerosante primaria, psoriasis tipo 1, psoriasis tipo 2, leucopenia idiopática, neutropenia autoinmune, enfermedad renal NOS, glomerulonefritis, vasculitis microscópica de los riñones, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso discoide, esterilidad masculina idiopática o NOS, autoinmunidad del espermatozoides, esclerosis múltiple (todos los subtipos), oftalmia simpática, hipertensión pulmonar secundaria a una enfermedad del tejido conectivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nodosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumática, enfermedad de Still, esclerosis sistémica, síndrome de Sjogren, enfermedad/arteritis de Takayasu, trombocitopenia autoinmune, trombocitopenia idiopática, enfermedad tiroidea autoinmune, hipertiroidismo, hipotiroidismo autoinmune bocioso (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmune atrófico, mixedema primaria, uveítis

facogénica, vasculitis primaria, vitiligo, enfermedad hepática aguda, enfermedad hepática crónica, cirrosis alcohólica, daño hepático inducido por alcohol, colestasis, enfermedad hepática idiosincrática, hepatitis inducida por drogas, esteatohepatitis no alcohólica, alergia, infección por estreptococos grupo B (GBS), trastornos mentales (por ejemplo, depresión y esquizofrenia), enfermedades mediadas por tipo Th2 y tipo Th1, dolor agudo y crónico (diferentes formas de dolor), distintos tipos de cáncer tales como cáncer de pulmón, mama, estómago, vejiga, colon, páncreas, ovario, próstata y rectal y formas malignas hematopoyéticas (leucemia y linfoma), abetalipoproteinemia, acrocianosis, procesos parasitarios o infecciosos agudos y crónicos, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), infección bacteriana aguda o crónica, pancreatitis aguda, insuficiencia renal aguda, adenocarcinomas, latidos ectópicos atriales, complejo de demencia del SIDA, hepatitis inducida por alcohol, conjuntivitis alérgica, dermatitis por contacto alérgica, rinitis alérgica, rechazo a aloinjertos, déficit de alfa-1-antitripsina, esclerosis lateral amiotrófica, anemia, angina pectoris, degeneración de células del asta anterior, terapia anti-CD3, síndrome antifosfolípido, reacciones de hipersensibilidad anti-receptor, aneurismas aórticos y periféricos, disección aórtica, hipertensión arterial, arterioesclerosis, fístula arteriovenosa, ataxia, fibrilación auricular (sostenida o paroxística), taquicardia auricular, bloqueo aurículoventricular, linfoma de células B, rechazo de injerto óseo, rechazo de transplante de médula ósea (BMT), bloqueo de ramas de haz de His, linfoma de Burkitt, acidez estomacal, arritmias cardíacas, síndrome de *atontamiento* cardíaco, tumores cardíacos, cardiomiopatía,

respuesta de inflamación a una derivación [*bypass*] cardiopulmonar, rechazo al trasplante de cartílago, degeneraciones de la corteza del cerebelo, trastornos del cerebelo, taquicardia auricular caótica o multifocal, trastornos asociados con una quimioterapia, leucemia mielocítica crónica (CML), alcoholismo crónico, patologías inflamatorias crónicas, leucemia linfocítica crónica (CLL), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), intoxicación crónica por salicilato, carcinoma colorrectal, insuficiencia cardíaca congestiva, conjuntivitis, dermatitis por contacto, cor pulmonale, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, sepsis con cultivo negativo, fibrosis quística, trastornos asociados con una terapia con citoquinas, demencia pugilística, enfermedades desmielinizantes, fiebre hemorrágica del dengue, dermatitis, condiciones dermatológicas, diabetes, enfermedad ateriosclerótica diabética, enfermedad de cuerpos difusos de Lewy, cardiomiopatía congestiva dilatada, trastornos del ganglio basal, síndrome de Down en la edad madura, trastornos del movimiento inducidos por drogas que bloquean los receptores de dopamina del CNS, sensibilidad a drogas, eczema, encefalomielitis, endocarditis, endocrinopatía, epiglotitis, infección por el virus Epstein-Barr, eritromelalgia, trastornos extrapiramidales y del cerebelo, linfohistiocitosis hematofagocítica familiar, rechazo al implante de timo fetal, ataxia de Friedreich, trastornos funcionales de las arterias periféricas, sepsis fúngicas, gangrena gaseosa, úlcera gástrica, nefritis glomerular, rechazo a injertos de cualquier órgano o tejido, sepsis Gram-negativa, sepsis Gram-positiva, granulomas debidos a organismos intracelulares, leucemia de células pilosas, enfermedad de Hallervorden-Spatz, tiroiditis de Hashimoto, fiebre del heno,

rechazo al trasplante de corazón, hemacromatosis, hemodiálisis, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombótica, hemorragia, hepatitis A, arritmias del haz de His, infección por VIH/neuropatía por VIH, enfermedad de Hodgkin, trastornos de movimientos hiperquinéticos, reacciones de hipersensibilidad, pneumonitis por hipersensibilidad, hipertensión, trastornos de movimientos hipoquinéticos, evaluación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, enfermedad de Addison idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, citotoxicidad mediada por anticuerpos, astenia, atrofia muscular espinal infantil, inflamación de la aorta, influenza A, exposición a radiación ionizante, iridociclitis/uveítis/neuritis óptica, lesiones por reperfusión isquémica, accidente cerebrovascular isquémico, artritis reumática juvenil, atrofia muscular espinal juvenil, sarcoma de Kaposi, rechazo al trasplante de riñón, legionella, leishmaniasis, lepra, lesiones del sistema corticoespinal, lipedema, rechazo al trasplante de hígado, linfedema, malaria, linfoma maligno, histiocitosis maligna, melanoma maligno, meningitis, meningococcemia, metabólica/idiopática, migraña cefalea, trastorno mitocondrial multisistémico, enfermedad del tejido conectivo mixto, gammopatía monoclonal, mieloma múltiple, degeneraciones de múltiples sistemas (Mencel, Dejerine-Thomas, Shi-Drager y Machado-Joseph), miastenia grave, *Mycobacterium avium intracellulare*, *Mycobacterium tuberculosis*, síndrome mielodiplástico, infarto de miocardio, trastornos isquémicos del miocardio, carcinoma nasofaríngeo, enfermedad pulmonar neonatal crónica, nefritis, nefrosis, enfermedades neurodegenerativas, atrofas musculares neurogénicas, fiebre neutropénica, linfoma no Hodgkins, oclusión de la aorta abdominal y sus ramas, trastornos

arteriales oclusivos, terapia con OKT3®, orquitis/epididimitis, procedimientos de reversión de orquitis/vasectomía, organomegalia, osteoporosis, rechazo al trasplante de páncreas, carcinoma pancreático, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia maligna, rechazo al trasplante de paratiroides, enfermedad inflamatoria pélvica, rinitis perenne, enfermedad del pericardio, enfermedad aterosclerótica periférica, trastornos vasculares periféricos, peritonitis, anemia perniciosa, neumonía por *Pneumocystis carinii*, neumonía, síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammopatía monoclonal y síndrome de cambios de piel), síndrome de post-perfusión, síndrome postbomba, síndrome de cardiectomía post-MI, preeclampsia, parálisis supranuclear progresiva, hipertensión pulmonar primaria, terapia de radiación, fenómeno de Raynaud, enfermedad de Raynaud, enfermedad de Refsum, taquicardia por QRS estrecho regular, hipertensión renovascular, lesión por reperfusión, cardiomiopatía restrictiva, sarcomas, corea senil, demencia senil de tipo cuerpo de Lewy, artropatías seronegativas, shock, anemia de células falsiformes, rechazo de aloinjertos de piel, síndrome de cambios de piel, rechazo al trasplante de intestino delgado, tumores sólidos, arritmias específicas, ataxia espinal, degeneraciones espinocerebelosas, miositis estreptococcica, lesiones estructurales del cerebelo, panencefalitis esclerosante subaguda, síncope, sífilis del sistema cardiovascular, anafilaxia sistémica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, artritis reumática juvenil de comienzo sistémico, ALL por células T o FAB, telangiectasia, tromboangitis obliterans, trombocitopenia, toxicidad, trasplantes, traumatismo/hemorragia, reacciones de hipersensibilidad

tipo III, hipersensibilidad de tipo IV, angina inestable, uremia, urosepsis, urticaria, enfermedades de las válvulas cardíacas, venas varicosas, vasculitis, enfermedades venosas, trombosis venosa, fibrilación ventricular, infecciones virales y fúngicas, encefalitis viral/meningitis aséptica, síndrome hemafagocítico asociado a virus, síndrome de Wernicke-Korsakoff, síndrome de Wilson, rechazo a xenoinjertos de cualquier órgano o tejido, síndromes coronarios agudos, polineuritis idiopática aguda, polirradiculopatía inflamatoria desmielinizante aguda, isquemia aguda, enfermedad de Still del adulto, *Alopecia areata*, anafilaxis, síndrome de anticuerpo antifosfolípido, anemia aplásica, arteriosclerosis, eczema atópico, dermatitis atópica, dermatitis autoinmune, trastorno autoinmune asociado con una infección por estreptococo, enteropatía autoinmune, síndrome de pérdida de la audición autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS), miocarditis autoinmune, insuficiencia ovárica prematura autoinmune, blefaritis, bronquiectasias, penfigoide bulloso, enfermedad cardiovascular, síndrome antifosfolípido catastrófico, enfermedad celíaca, espondilosis cervical, isquemia crónica, penfigoide cicatricial, síndrome clínicamente aislado (CIS) con riesgo de esclerosis múltiple, conjuntivitis, trastorno psiquiátrico en la niñez, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), dacriocistitis, dermatomiositis, retinopatía diabética, hernia de disco, prolapso de disco, anemia hemolítica inmune inducida por drogas, endocarditis, endometriosis, endoftalmitis, episcleritis, eritema multiforme, eritema multiforme mayor, penfigoide gestacional, síndrome de Guillain-Barre (GBS), fiebre del heno, síndrome de Hughes, enfermedad de Parkinson idiopática, neumonía intersticial idiopática, alergia mediada por IgE,

anemia hemolítica inmune, miositis por cuerpos de inclusión, enfermedad inflamatoria infecciosa ocular, enfermedad inflamatoria desmielinizante, enfermedad inflamatoria del corazón, enfermedad inflamatoria del riñón, IPF/UIP, iritis, queratitis, queratoconjuntivitis seca, enfermedad de Kussmaul o enfermedad de Kussmaul-Meier, parálisis de Landry, histiocitosis de las células de Langerhans, *Livido reticularis*, poliangitis microscópica con degeneración macular, morbus Bechterev, trastorno neuronal motor, penfigoide de la membrana mucosa, insuficiencia multiorgánica, miastenia gravis, síndrome mielodisplásico, miocarditis, trastornos de las raíces nerviosas, neuropatía, hepatitis no-A no-B, neuritis óptica, osteolisis, cáncer de ovario, JRA pauciarticular, enfermedad oclusiva arterial periférica (PAOD), enfermedad vascular periférica (PVD), enfermedad arterial periférica (PAD), flebitis, poliarteritis nodosa (o periarteritis nodosa), policondritis, polimialgia reumática, poliosis, JRA Poliarticular, síndrome de deficiencia poliendócrina, polimiositis, polimialgia reumática (PMR), síndrome de post-bomba, parkinsonismo primario, cáncer de próstata y rectal y formas malignas hematopoyéticas (leucemia y linfoma), prostatitis, aplasia de glóbulos rojos pura, insuficiencia adrenal primaria, neuromielitis óptica recurrente, restenosis, enfermedad del corazón reumático, SAPHO (sinovitis, acne, pustulosis, hiperostosis y osteitis), amiloidosis secundaria, pulmón de shock, escleritis, ciática, insuficiencia adrenal secundaria, enfermedad del tejido conectivo asociada a siliconas, dermatosis de Sneddon-Wilkinson, espondilitis anquilosante, síndrome de Stevens-Johnson (SJS), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, arteritis temporal, retinitis toxoplásmica, necrólisis

epidérmica tóxica, mielitis transversa, TRAPS (síndrome periódico asociado al receptor del factor de necrosis tumoral), reacción alérgica de Tipo 1, diabetes de Tipo II, urticaria, neumonía intersticial usual (UIP), vasculitis, conjuntivitis vernal, retinitis viral, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (síndrome VKH), degeneración macular húmeda y cicatrización de heridas.

En una forma de realización, los métodos y las composiciones que se describen en la presente se usan para tratar el dolor en un individuo que sufre de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en un cáncer primario, un cáncer metastásico, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de pulmón, cáncer orofaríngeo, cáncer hipofaríngeo, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de vesícula, cáncer de los ductos biliares, cáncer de intestino delgado, cáncer de colon, cáncer del tracto urinario, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer del urotelio, cáncer del tracto genital femenino, cáncer cervical, cáncer de útero, cáncer de ovario, coriocarcinoma, enfermedad trofoblástica gestacional, cáncer del tracto genital masculino, cáncer de próstata, cáncer de vesículas seminales, cáncer de testículo, tumor de células germinales, cáncer de glándula glándulas endócrinas, cáncer de tiroides, cáncer adrenal, cáncer de la glándula pituitaria , cáncer de piel, hemangioma, melanoma, sarcoma, cáncer de hueso, cáncer de tejidos blandos, sarcoma de Kaposi, tumor de cerebro, cáncer de nervios, cáncer de los ojos, cáncer de las meninges, astrocitoma, glioma, glioblastoma, retinoblastoma, neuroma, neuroblastoma, Schwannoma, meningioma, un tumor sólido que surge de una forma maligna hematopoyética, leucemia, linfoma de Hodgkin y linfoma no

Hodgkin.

Descripción breve de las figuras

La Figura 1A es una representación esquemática de construcciones de inmunoglobulinas de dominio variable dual (DVD)-Ig y se muestra la estrategia para la generación de una molécula de DVD-Ig a partir de dos anticuerpos parentales.

En la Figura 1B se muestran representaciones esquemáticas de construcciones genéticas para DVD1-Ig, DVD2-Ig y dos anticuerpos monoclonales quiméricos, monoespecíficos, 2D13.E3 (anti-IL-1 α) y 13F5.G5 (anti-IL-1 β). "VH β " y "VL β " indican, respectivamente, un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena liviana de un sitio de unión al antígeno del anticuerpo 13F5.G5 que se une a la IL- β . "VH α " y "VL α " indican, respectivamente, un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena liviana del anticuerpo 3D12.E3 que se une a la IL- α . "L" indica una secuencia directriz. En el diagrama de la construcción genética para DVD2-Ig, las marcas horizontales entre "VH β " y "VH α " y entre "VL β " y "VL α " indican la presencia de una secuencia conectora.

En la Figura 2 se muestran gráficos de barra de la calificación histológica del cartílago de las articulaciones de ratones en un modelo con inestabilidad de articulaciones (JIM) de osteoartritis. Cada conjunto de gráficos de barra provee la calificación del cartílago de las articulaciones de rodillas de ratones en cuatro grupos de tratamiento: tratamiento con vehículo de solución amortiguadora salina fosfato (PBS) solamente ("PBS"), tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-

IL-1 α ("mAb anti-IL-1 α "), tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β ("mAb anti-IL-1 β ") y tratamiento con una combinación de anticuerpos monoclonales anti-IL-1 α y anti-IL-1 β ("mAb anti-IL-1 α + mAb anti-IL-1 β "). Los gráficos de barra individuales dentro de cada conjunto muestra la calificación de histología total y las calificaciones de tres zonas separadas, en donde cada zona es un tercio del área del cartílago medial de la tibia (zona 1: zona interna, zona 2: zona media y zona 3: zona externa). De izquierda a derecha: gráfico de barras de la calificación total para las zonas mediales de la tibia 1, 2 y 3; gráfico de barras de calificación para la zona medial de la tibia 1; gráfico de barras de la calificación para la zona medial de la tibia 2; y gráfico de barras de la calificación para la zona medial de la tibia 3. Véase el Ejemplo 3.3.1.

En la Figura 3 se muestran gráficos de barra de la calificación histológica del cartílago de las articulaciones de ratones en un modelo con inestabilidad de articulaciones (JIM) de osteoartritis. Cada conjunto de gráficos de barra provee la calificación del cartílago de las articulaciones de rodillas de ratones en cuatro grupos de tratamiento: tratamiento con vehículo de PBS solamente ("Vehículo"), tratamiento con una combinación de un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α y un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β ("mAb anti-IL-1 α (6 mg/kg) + mAb anti-IL-1 β (6 mg/kg)"), tratamiento con una proteína de unión mIL-1 α / β DVD-Ig a 6 mg/kg ("IL-1 α / β DVD-Ig (6 mg/kg)") y tratamiento con una proteína de unión mIL-1 α / β DVD-Ig a 12 mg/kg ("IL-1 α / β DVD-Ig (12 mg/kg)"). Los gráficos de barra individuales dentro de cada conjunto muestra la calificación de histología total y las calificaciones de tres zonas separadas, en donde cada zona es un tercio del área

del cartílago medial de la tibia (zona 1: zona interna, zona 2: zona media y zona 3: zona externa). De izquierda a derecha: gráfico de barras de la calificación total para las zonas mediales de la tibia 1, 2 y 3; gráfico de barras de calificación para la zona medial de la tibia 1; gráfico de barras de la calificación para la zona medial de la tibia 2; y gráfico de barras de la calificación para la zona medial de la tibia 3. Véase el Ejemplo 3.3.2.

En la Figura 4 se muestran gráficos de barra de la calificación histológica del cartílago de las articulaciones de ratones en un modelo con inestabilidad de articulaciones (JIM) de osteoartritis. Cada conjunto de gráficos de barra provee la calificación del cartílago de las articulaciones de rodillas de ratones en cuatro grupos de tratamiento: tratamiento con vehículo de PBS solamente ("Vehículo"), tratamiento con una combinación de un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α (6 mg/kg) y un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β (6 mg/kg) ("mAb anti-IL-1 α (6 mg/kg) + mAb anti-IL-1 β (6 mg/kg)"), tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β (12 mg/kg) ("mAb anti-IL-1 β (12 mg/kg)"), tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β (6 mg/kg) ("mAb anti-IL-1 β (6 mg/kg)") y tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β (3 mg/kg) ("mAb anti-IL-1 β (3 mg/kg)"). Los gráficos de barra individuales dentro de cada conjunto muestra la calificación de histología total y las calificaciones de tres zonas separadas, en donde cada zona es un tercio del área del cartílago medial de la tibia (zona 1: zona interna, zona 2: zona media y zona 3: zona externa). De izquierda a derecha: gráfico de barras de la calificación total para las zonas mediales de la tibia 1, 2 y 3; gráfico de barras de calificación para la zona medial de la tibia 1; gráfico de barras de la

calificación para la zona medial de la tibia 2; y gráfico de barras de la calificación para la zona medial de la tibia 3. Véase el Ejemplo 3.3.3.

En la Figura 5 se muestra el nivel de producción de IL-6 inducida por zimosán (pg/ml) en animales en un modelo de osteoartritis con inestabilidad de articulaciones cuando se tratan con vehículo de PBS solamente ("Vehículo"), con una combinación de un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α (6 mg/kg) y un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β (6 mg/kg) ("mAb anti-IL-1 α (6 mg/kg) + mAb anti-IL-1 β (6 mg/kg)"), con una proteína de unión mIL-1 α/β DVD-Ig a 6 mg/kg ("IL-1 α/β DVD (6 mg/kg)") y tratamiento con proteína de unión mIL-1 α/β DVD-Ig a 12 mg/kg ("IL-1 α/β DVD (12 mg/kg)"). Véase el Ejemplo 3.3.4.

En la Figura 6 se muestra suma total de las calificaciones de degeneración de cartílago en animales en un modelo de osteoartritis con desestabilización del menisco medio (DMM) tratado con Vehículo de PBS ("Vehículo"), con una combinación de un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α (6 mg/kg) y un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β (6 mg/kg) ("mAb anti-IL-1 α (6 mg/kg) + mAb anti-IL-1 β (6 mg/kg)") y con una proteína de unión mIL-1 α/β DVD-Ig a 6 mg/kg ("IL-1 α/β DVD (6 mg/kg)"). Véase el Ejemplo 3.3.5.

En la Figura 7 se muestran los resultados de un estudio de 8 semanas de varios tratamientos de la degeneración del cartílago en animales en un modelo de osteoartritis con desestabilización de menisco medio (DMM). Cada gráfico de barras indica la suma del promedio de las calificaciones de degeneración del cartílago en animales tratados con vehículo de PBS solamente ("Vehículo"), con un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α (6 mg/kg) ("mAb anti-IL-1 α 6 mg/kg"), con un

anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β (6 mg/kg) ("anti-IL-1 β 6 mg/kg"), con una combinación de un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α (6 mg/kg) y un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β (6 mg/kg) ("mAb anti-IL-1 α (6 mg/kg) + mAb anti-IL-1 β (6 mg/kg)"), con una proteína de unión mIL-1 α/β DVD-Ig a razón de 1,5 mg/kg ("IL-1 α/β DVD 1,5 mg/kg"), con una proteína de unión mIL-1 α/β DVD-Ig a razón 3 mg/kg ("IL-1 α/β DVD 3 mg/kg"), o con una proteína de unión mIL-1 α/β DVD-Ig a razón de 6 mg/kg ("IL-1 α/β DVD 6 mg/kg"). Véase el Ejemplo 3.3.6.

En la Figura 8 se muestran los resultados de un estudio de 4 semanas del tratamiento de animales en un modelo de osteoartritis con desestabilización de menisco medio (DMM) con vehículo solamente ("Vehículo"), doxiciclina (30 mg/kg) ("Doxiciclina (30 mg/kg)") o una combinación de un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α (6 mg/kg) y un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β (6 mg/kg) ("mAb anti-IL-1 α (6 mg/kg) + mAb anti-IL-1 β (6 mg/kg)"). Véase el Ejemplo 3.3.7.

En la Figura 9 se muestran gráficos de barra del umbral de retiro de pata (gramos, "g") en las patas de ratones con cirugía del DMM los Días 7, 14, 21, 28 y 35. El umbral de retiro de pata de las patas con DMM ("DMM") había disminuido significativamente en comparación con la pata contralateral (no quirúrgica) ("Contra") y con cirugía simulada de la pata ("Simulada"). Las patas con DMM era alodínicas tan pronto como para el día 7 y presentaron este comportamiento de dolor hasta el día 35. Véase el Ejemplo 4.

En la Figura 10 se muestran gráficos de barra del umbral de retiro de pata (gramos, "g") en ratones DMM después del tratamiento con vehículo solamente ("Control de PBS"), con control de isotipo de IgG (control positivo para la

enfermedad y el dolor establecidos "Control de IgG") o con una combinación de anticuerpos monoclonales anti-IL-1 α y anti-IL-1 β ("mAb anti-IL-1 α (6 mg/kg) + mAb anti-IL-1 β (6 mg/kg)") después de 5 semanas (día 35) en comparación con la pata contralateral (no quirúrgica) ("Contralateral") y pata con cirugía simulada ("Simulada"). Los datos indican que la neutralización de ambas IL-1 α e IL-1 β impidió significativamente el desarrollo de alodinia. Se observó una eficacia similar en los animales tratados después de una semana (no se muestra). Véase el Ejemplo 4.

En la Figura 11 se muestran gráficos de barra del umbral de retiro de pata (gramos, "g") en ratones DMM tratados previamente con control de isotipo de IgG (control positivo para la enfermedad y el dolor establecidos) durante 35 días y a quienes se les administró luego una combinación de anticuerpos monoclonales anti-IL-1 α o anti-IL-1 β y evaluados luego por el umbral de retiro de pata 24 horas después el día 36 ("mAb anti-IL-1 α (6 mg/kg) + anti-IL-1 β (6 mg/kg) (24 horas de post-dosificación)"). A efectos comparativos, se proveen los valores del umbral de retiro de pata para el día 35 para la pata contralateral (no quirúrgica) ("Contralateral"), la pata con cirugía simulada ("Simulada"), tratamiento con vehículo solamente ("Control de PBS"), tratamiento con el isotipo IgG ("Control de IgG") y la pata quirúrgica tratada con una combinación de anticuerpos monoclonales anti-IL-1 α y anti-IL-1 β ("mAb anti-IL-1 α (6 mg/kg) + mAb anti-IL-1 β (6 mg/kg)") después de 5 semanas (día 35). Los datos indican que la neutralización de ambas IL-1 α e IL-1 β revirtió significativamente la alodinia en los ratones con dolor establecido. Véase el Ejemplo 4.

En la Figura 12 se muestran gráficos de barra del umbral de retiro de pata (gramos, "g") en ratones DMM tratados con vehículo de PBS solamente ("Vehículo"), con un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α (6 mg/kg) ("mAb anti-IL-1 α (6 mg/kg)"), con un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β (6 mg/kg) ("mAb anti-IL-1 β (6 mg/kg)") o con una combinación de un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α (6 mg/kg) y un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β (6 mg/kg) ("mAb anti-IL-1 α (6 mg/kg) + mAb anti-IL-1 β (6 mg/kg)") administrados por vía intraperitoneal (ip) dos veces por semana durante cuatro semanas. Se evaluó la alodinia en los animales el día 28. El gráfico de barras "Contralateral" provee el umbral de retiro de pata de una extremidad representativa no quirúrgica (contralateral). La extremidad ipsilateral (quirúrgica) de los animales en los grupos tratados con vehículo era alodínica (con dolor) en comparación con la extremidad contralateral (no quirúrgica) o en comparación con animales sometidos a una cirugía simulada ("Simulada"). Véase el Ejemplo 5.

En la Figura 13 se muestran gráficos de barra del umbral de retiro de pata (gramos, "g") en ratones DMM tratados con vehículo de PBS solamente ("Vehículo") o con una combinación de un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α y un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β , ambos administrados por vía intraperitoneal (ip) cada cuatro días durante cuatro semanas a razón de 1 mg/kg ("mAb anti-IL-1 α (1 mg/kg) + mAb anti-IL-1 β (1 mg/kg)"), 3 mg/kg ("mAb anti-IL-1 α (3 mg/kg) + mAb anti-IL-1 β (3 mg/kg)") o 6 mg/kg ("mAb anti-IL-1 α (6 mg/kg) + mAb anti-IL-1 β (6 mg/kg)"). Los animales fueron evaluados el día 28. La extremidad ipsilateral (quirúrgica) de los animales en los grupos tratados con vehículo de PBS

solamente era alodínica (con dolor) en comparación con la extremidad contralateral (no quirúrgica) ("Contralateral") o en comparación con animales sometidos a una cirugía simulada ("Simulada"). Los resultados muestran que el tratamiento con una combinación de un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α y un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β impide el desarrollo de alodinia en ratones DMM de una manera relacionada con la dosis. Véase el Ejemplo 6.

En la Figura 14 se muestran gráficos de barra del umbral de retiro de pata (gramos, "g") cuando los ratones DMM con una osteoartritis y alodinia mecánica establecidas fueron tratados el día 27 con una combinación de un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α y un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β , ambos administrados por vía intraperitoneal (ip) a razón de 1 mg/kg ("mAb anti-IL-1 α (1 mg/kg) + mAb anti-IL-1 β (1 mg/kg)"), 3 mg/kg ("mAb anti-IL-1 α (3 mg/kg) + mAb anti-IL-1 β (3 mg/kg)") o 6 mg/kg ("mAb anti-IL-1 α (6 mg/kg) + mAb anti-IL-1 β (6 mg/kg)"), 24 horas antes de la prueba de alodinia el día 28. La extremidad ipsilateral (quirúrgica) de los animales en los grupos tratados con vehículo ("Vehículo") era alodínica (con dolor) en comparación con la extremidad contralateral (no quirúrgica) ("Contralateral") o en comparación con animales sometidos a una cirugía simulada ("Simulada"). Los resultados muestran que el tratamiento con una combinación de un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α y un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β revierte la alodinia establecida en ratones DMM con enfermedad establecida de una manera relacionada con la dosis. Véase el Ejemplo 7.

En la Figura 15 se muestran gráficos de barra de latencia hasta el retiro de

pata (segundos, "s") en animales en un modelo de dolor inflamatorio inducido por carragenina (hiperalgesia) en ratón. A las 30 horas después de una inyección de carragenina intraplantar, los ratones fueron tratados con un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α solamente (900 μ g) ("mAb anti-IL-1 α "), un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β solamente (900 μ g) ("mAb anti-IL-1 β "), una combinación de anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α (900 μ g) y anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β (900 μ g) ("mAb anti-IL-1 α + mAb anti-IL-1 β "), vehículo de PBS ("PBS") o control de isotipo de IgG ("IgG"). A otro grupo se le administró una dosis (30 mg/kg) de diclofenac (control de analgésico anti-inflamatorio no esteroide) a las 47 y 95 horas después de la administración intraplantar de carragenina. La evaluación de hiperalgesia térmica usando un estímulo de calor radiante se efectuó 48 horas (Figura 15A) y 96 horas (Figura 15B) después de la administración intraplantar de carragenina. Las barras rellenas muestran la latencia hasta el retiro de pata de la pata control (sin carragenina). Las barras abiertas muestran la latencia hasta el retiro de pata para la pata con administración de carragenina. Véase el Ejemplo 8.

En la Figura 16 se muestran gráficos de barra de latencia hasta el retiro de pata (segundos, "s") en animales en un modelo de dolor inflamatorio inducido por carragenina (hiperalgesia) en ratones. A las 30 horas después de la inyección intraplantar de carragenina, los ratones fueron tratados con vehículo ("PBS"), con control de isotipo de IgG ("IgG") o con una de tres dosis de una combinación de un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α y un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β , en donde de cada anticuerpo monoclonal se administraron 100 μ g ("mAb anti-IL-1 α (100 μ g) + mAb anti-IL-1 β (100 μ g) "), 300 μ g ("mAb anti-IL-1 α (300 μ g) + mAb

anti-IL-1 β (300 μ g)") o 900 μ g ("mAb anti-IL-1 α (900 μ g) + mAb anti-IL-1 β (900 μ g)"). A otro grupo se le administró una dosis (30 mg/kg) de diclofenac (control positivo de analgésico anti-inflamatorio no esteroide) a las 47 y 95 horas después de la administración intraplantar de carragenina. La evaluación de hiperalgesia térmica usando un estímulo de calor radiante se efectuó 48 horas (Figura 16A) y 96 horas (Figura 16B) después de la administración intraplantar de carragenina. Las barras rellenas muestran la latencia hasta el retiro de pata de la pata control (sin carragenina). Las barras abiertas muestran la latencia hasta el retiro de pata para la pata con administración de carragenina. Véase el Ejemplo 9.

En la Figura 17 se muestran los resultados de la evaluación de una terapia combinada con anticuerpos monoclonales anti-IL-1 α y anti-IL-1 β en un modelo de dolor inflamatorio por CFA ("Adyuvante de Freund completo) en ratones. A las 30 horas después de la inyección intraplantar de CFA, los ratones fueron tratados con una combinación de un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α (900 μ g) y un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β (900 μ g), con vehículo de PBS ("PBS") o con control de isotipo de IgG ("IgG"). A otro grupo se le administró una dosis (30 mg/kg) de diclofenac (control positivo de analgésico anti-inflamatorio no esteroide) a las 47 después de la administración intraplantar de CFA. La evaluación de la alodinia mecánica en los animales usando un monofilamento de von Frey se realizó 48 horas después de la administración de CFA. En la Figura 17A se muestran gráficos de barra del umbral de retiro de pata (gramos, "g"). Las barras rellenas muestran el umbral de retiro de pata para las patas control contralaterales (sin CFA). Las barras abiertas muestran el umbral de retiro de pata para las patas

con administración de CFA en los animales de los grupos de tratamiento. En la Figura 17B se muestran gráficos de barra para la magnitud de eficacia (% MPE) en los animales de los grupos de tratamiento. Véase el Ejemplo 10.

En la Figura 18 se muestran gráficos de barra del umbral de retiro de pata (gramos, "g") en los animales de un modelo de dolor neuropático con ligación del nervio espinal L5/L6 (SNL) en ratones. Los animales fueron tratados el día 6 después de la cirugía SNL con una combinación de un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α (900 μ g) y un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β (900 μ g) ("mAb anti-IL-1 α + mAb anti-IL-1 β "), con vehículo de PBS ("PBS") o con control de isotipo de IgG ("IgG"). La evaluación de la alodinia mecánica de los animales usando un monofilamento de von Frey se efectuó a las 24 horas (Figura 18A) y 72 horas (Figura 18B) después de la cirugía SNL. Otro grupo fue tratado con gabapentina (100 mg/kg, "Gabapentina") 1 hora antes de la evaluación como control positivo. Véase el Ejemplo 11.

En la Figura 19 se muestran gráficos de barra para la magnitud de eficacia (% MPE) en los animales de los grupos de tratamiento a las 24 y 72 horas como se describe para la Figura 18. "Vehículo" indica animales SNL tratados con vehículo de PBS. "IgG" indica animales SNL tratados con control de isotipo de IgG. "IL-1 α β " indica animales tratados con una combinación de un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α (900 μ g) y un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β . Véase el Ejemplo 11.

Descripción detallada de la invención

La invención se basa en el descubrimiento que el bloqueo de la función de

la interleuquina-1 (IL-1) puede constituir un medio efectivo para tratar la osteoartritis (OA) en un individuo (humano u otro mamífero). De acuerdo con la invención, el bloqueo de la función de la IL-1 para tratar la OA se puede lograr mediante administración a un individuo de una o más proteínas que se unen a la IL-1 α y a la IL-1 β . Dicha terapia "específica doble" se puede lograr mediante la administración a un paciente con OA de una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo) que se une a la IL-1 α y una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo) que se une a la IL-1 β o por administración de una proteína de unión multivalente y multiespecífica que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β . Dicha proteína de unión multivalente y multiespecífica de utilidad en la invención incluye una proteína de unión de un dominio variable dual de inmunoglobulina (también denominada proteína de unión o molécula "DVD-Ig™" o "DVD-Ig" en la presente). Véase, por ejemplo, la Publicación PCT N°: WO 2007/024715 y Wu et al., (2007) *Nature Biotech.*, 25(11): 1290-1297. Se puede evaluar si una combinación particular de proteínas de unión a IL-1 α e IL-1 β o una molécula específica de DVD-Ig que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β será de utilidad en el tratamiento de OA usando un modelo de OA en animales, tal como el modelo de inestabilidad de articulaciones (JIM) en la OA o el modelo de desestabilización del menisco medio (DMM) en la OA (Glasson et al., (2007) *Osteoarthritis Cart.* 15(9): 1061-9).

A menos que se los defina de otro modo en la presente, los términos científicos y técnicos usados con relación a la presente invención tienen los significados que comúnmente les dan los especialistas en el arte. El significado y el alcance de los términos deberían ser claros; sin embargo, en el caso en que

haya una ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en la presente tienen prioridad sobre cualquier definición de diccionario o extrínseca. Además, a menos que lo requiera de otro modo el contexto, los términos en singular incluirán las formas en plural, y los términos en plural incluirán las formas singulares. En esta solicitud, el uso de “o” significa “y/o”, a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término “incluir”, así como otras formas, tales como “incluye” e “incluido”, no es limitativo. Además, los términos tales como “elemento” o “componente” abarcan los elementos y los componentes que constituyen una unidad, y los elementos y los componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

En general, las nomenclaturas usadas con relación al cultivo de células y tejidos, la biología molecular, la inmunología, la microbiología, la genética y la química de proteínas y ácidos nucleicos y la hibridación de ácidos nucleicos que se describen en la presente, y los procedimientos correspondientes, son aquellos bien conocidos y de uso común en el arte. Los métodos y los procedimientos de la presente invención generalmente se llevan a cabo de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en el arte y según se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se describen en esta memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario. Las reacciones enzimáticas y los procedimientos de purificación se llevan a cabo de acuerdo con las especificaciones del proveedor, como comúnmente se los lleva a cabo en el arte o como se describe en la presente. Las nomenclaturas usadas y los procedimientos y las técnicas de laboratorio, la química analítica, química de

síntesis orgánica y la química medicinal y farmacéutica que se describen en la presente son bien conocidos y usados comúnmente en el arte. Se usan técnicas estándar para las síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración, y tratamiento de pacientes.

Para que la presente invención se comprenda con mayor facilidad, a continuación se definen determinados términos seleccionados.

El término "polipéptido" significa cualquier cadena polimérica de aminoácidos. Los términos "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente con el término polipéptido y también se refieren a una cadena polimérica de aminoácidos. El término "polipéptido" abarca proteínas nativas o artificiales, fragmentos de proteínas y análogos de polipéptidos de una secuencia de proteína. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

El término "proteína aislada" o "polipéptido aislado" hace referencia a una proteína o un polipéptido que, en virtud de su origen o la fuente de la que deriva, no está asociado con los componentes con los que se asocia y que lo acompañan en su estado nativo; está sustancialmente libre de otras proteínas de la misma especie; es expresado por una célula de una especie diferente; o no aparece en la naturaleza. Por consiguiente, un polipéptido que es sintetizado por medios químicos o es sintetizado en un sistema celular diferente de la célula en la que se origina naturalmente estará "aislado" de los componentes con los que se halla asociado en la naturaleza. Una proteína también se puede liberar sustancialmente de los componentes con los que se halla asociada en la naturaleza si se la aísla usando procedimientos de purificación de proteínas bien conocidos en el arte.

El término “recuperación” hace referencia al proceso de liberar sustancialmente una especie química, tal como un polipéptido, de los componentes con los que está asociada en la naturaleza, por medio de su aislamiento, por ejemplo, con procedimientos de purificación de proteínas bien conocidos en el arte.

El término “IL-1 α humana” (también abreviada en la presente como “hIL-1 α ” o “IL-1 α ”) incluye una citoquina pleiotrópica relacionada con diversas respuestas inmunes, procesos inflamatorios y hematopoyesis. Por ejemplo, la IL-1 α incluye la citoquina humana que es producida por macrófagos activados, estimula la proliferación de timocitos por inducción de la liberación de IL-2, la maduración y la proliferación de células B y la actividad del factor de crecimiento de fibroblastos. El término “IL-1 α humana” incluye la IL-1 α humana recombinante (“rh IL-1 α ”), que se puede preparar con métodos de expresión recombinantes convencionales.

El término “IL-1 β humana” (también abreviada en la presente como “hIL-1 β ” o “IL-1 β ”) incluye una citoquina pleiotrópica relacionada con diversas respuestas inmunes, procesos inflamatorios y hematopoyesis. El término “IL-1 β ” humana incluye la IL-1 β humana recombinante (“rh IL-1 β ”), que se puede preparar mediante métodos de expresión recombinantes estándar.

En la tabla 1 se proveen las secuencias de aminoácidos de la IL-1 α y la IL-1 β humanas.

Tabla 1: Secuencias de la IL-1 α y la IL-1 β humanas

Proteína	Identificador de	Secuencia

	secuencia	
		123456789012345678901234567 890
Pro-IL-1 α humana	SEQ ID N°: 1	MAKVPDMFEDLKNCYSENEEDS SSIDHL SL NQKSFYHVSYGPLHEGCMDQS VSLSISSETS KTSKLTfKESMVVVATNGKVLKK RRLSLSQ SITDDDLEAIANDSEEEIIKPRSA PFSFLS NVKYNFMRIIKYEFILNDALNQSII RANDQ YLTAAALHNLDEAVKFDMGAYK SSKDDAKI TVILRISKtQLYVTAQDEDQPVL LKEMPEI PKTITGSETNLLFFWETHGTKNY FTSVAHP NLFIATKQDYWVCLAGGPPSITD FQILENQ A

IL-1 α humana madura	Residuos 113- 271 de la SEQ ID Nº: 1	SAPFSFLSNVKYNFMRIIKYEFIL NDALNQ SIIRANDQYLTAALHNLDEAVKF DMGAYK SSKDDAKITVILRISKTKLYVTAQ DEDQPV LLKEMPEIPKTITGSETNLLFFWE THGTKN YFTSVAHPNLFIA TKQDYWVCLA GGPPSIT DFQILENQA
IL-1 β humana madura	SEQ ID Nº: 2	APVRSLNCTLRDSQQKSLVMSG PYELKALH LQGQDMEQQVVFMSFVQGEE SNDKIPVAL GLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLE SVDPKNY PKKKMEKRFVFNKIEINN KLEFE SAQFPNW YISTSQAENMPVFLGGTKGGQDI TDFTMQF VSS

El término “actividad biológica” hace referencia a todas las propiedades

biológicas inherentes de la citoquina. Las propiedades biológicas de la IL-1 α y la IL-1 β incluyen, pero en un sentido no taxativo, la unión al receptor de IL-1.

La "actividad biológica" se refiere a todas las propiedades biológicas inherentes de la IL-1 α . Las propiedades biológicas de IL-1 α incluyen, pero en un sentido no taxativo, la unión al receptor de la IL-1 α ; la estimulación de la proliferación de timocitos por inducción de la liberación de IL-2, maduración y proliferación de células B y la actividad del factor de crecimiento de fibroblastos.

Los términos "unión específica" o "se une específicamente", según se usa en la presente, con referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, significan que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico o epítopo) sobre la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica en lugar de proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para el epítopo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítopo A (o A libre, sin marcar) en una reacción que contenga "A" marcado y el anticuerpo reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

El término "anticuerpo", se refiere en términos generales a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) compuesta por cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L), o cualquier fragmento funcional, mutante, variante o derivado de las mismas, que retienen las características esenciales de unión al epítopo de una molécula de Ig. Estos formatos de anticuerpos mutantes, variantes o derivados son conocidos en el arte.

En la presente se describirán formas de realización no taxativas de dichos formatos.

En un anticuerpo completo, cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada HCVR o VH en la presente) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios: CH1, CH2 y CH3. Cada cadena liviana está compuesta por una región variable de la cadena liviana (abreviada LCVR o VL en la presente) y una región constante de la cadena liviana. La región constante de la cadena liviana consiste en un dominio CL. Las regiones VH y VL pueden dividirse adicionalmente en regiones hipervariables, conocidas como regiones de determinación de la complementariedad (CDR), que están separadas por regiones conservadas, conocidas como regiones de marco de trabajo (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas, desde el extremo amino-terminal hacia el extremo carboxilo terminal, en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG 1, IgG2, IgG 3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

El término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, hIL-1 α). La función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser llevada a cabo por fragmentos de un anticuerpo completo. Estas formas de realización de anticuerpos también tienen formatos biespecíficos, con especificidad dual o multiespecíficos, es decir, pueden

unirse específicamente a dos o más antígenos diferentes. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados por el término “porción de unión al antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, que es un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, que es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos entre sí en la región bisagra a través de un enlace disulfuro; (iii) un fragmento Fd, que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv, que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341: 544-546), que consiste de un dominio VH; y (vi) una región de determinación de la complementariedad (CDR) aislada 544-546, publicación PCT No. WO 90/05144 A1), que comprende un único dominio variable; y (vi) una región aislada determinante de complementariedad (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, a saber, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden conectar entre sí usando un conector sintético que les permita prepararlos como una sola cadena de proteína, donde las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv); véanse, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242: 423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena simple (scFvs) también se consideran dentro del término “porción de unión al antígeno” de un anticuerpo. También se incluyen otras formas de anticuerpos, tales como los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes y biespecíficos donde los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena de polipéptido, pero usando un conector que es demasiado

corto para que los dos dominios se combinen en la misma cadena, con lo que se fuerza el apareamiento de dichos dominios con dominios complementarios de una cadena diferente y la formación de dos sitios de unión al antígeno (véanse, por ejemplo, Holliger, *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448; Poljak, *et al.* (1994) *Structure* 2: 1121-1123). Estas porciones de unión a anticuerpos son conocidas en el arte (Kontermann y Dübel eds., Antibody Engineering (Springer-Verlag, Nueva York, 2001) (ISBN 3-540-41354-5)).

El término “construcción de anticuerpo”, hace referencia a un polipéptido que comprende una o más porciones de unión al antígeno de la invención, unidas a un polipéptido conector o un dominio constante de inmunoglobulina. Los polipéptidos conectores comprenden dos o más residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, y se usan para unir una o más porciones de unión a antígeno. Estos conectores peptídicos son bien conocidos en el arte (véanse, por ejemplo, Holliger, *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448; Poljak, *et al.* (1994) *Structure* 2: 1121-1123). Un dominio constante de inmunoglobulina hace referencia a un dominio constante de una cadena pesada o liviana. Las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de la cadena pesada (gamma) y la cadena liviana (kappa y lambda) de la IgG humana son conocidas en el arte y se representan en la Tabla 2.

Tabla 2: Secuencias de los dominios constantes de las cadenas pesada y liviana de la IgG humana

Proteína	Identificador	Secuencia
----------	---------------	-----------

	de secuencia	
		123456789012345678901234567 890
<u>Región constante</u> <u>de Ig gamma-1</u>	SEQ ID N°: 3	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTA ALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKL

		TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
--	--	---

Región constante mutante de Ig gamma-1	SEQ ID N°: 4	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKL
--	--------------	---

		TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
Región constante de Ig Kappa	SEQ ID N°: 5	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
Región constante de Ig Lambda	SEQ ID N°: 6	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA TLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV ETTTPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHR SYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS

Adicionalmente, un anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, puede ser parte de las moléculas de inmunoadhesión más grandes, formadas mediante la asociación covalente o no covalente del anticuerpo o la porción de unión al antígeno con una o más proteínas o péptidos. Los ejemplos de estas moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región central de la estreptavidina para preparar una molécula de scFv tetramérica (Kipriyanov, S. et

al., (1995) *Human Antibod. Hybridomas* 6: 93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una marca de polihistidina C-terminal para preparar moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S. *et al.*, (1994) *Mol. Immunol.*, 31: 1047-1058). Las porciones de unión al antígeno de los anticuerpos, tales como los fragmentos Fab y F(ab')₂, pueden prepararse a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales como la digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Más aun, los anticuerpos, las porciones de unión al antígeno de los anticuerpos y las moléculas de inmunoadhesión pueden obtenerse usando técnicas de ADN recombinante, como se describe en la presente.

Un “anticuerpo aislado”, hace referencia a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a hIL-1 α está sustancialmente libre de los anticuerpos que se unen a antígenos distintos de hIL-1 α). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a la hIL-1 α puede presentar reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de IL-1 α de otras especies. Más aun, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o sustancias químicas.

El término “anticuerpo humano” incluye aquellos anticuerpos que comprenden regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones que

hayan sido introducidas por mutagénesis al azar o con especificidad de sitio in vitro, o por mutaciones somáticas in vivo), por ejemplo, en las CDR, y en particular, en CDR3. Sin embargo, el término “anticuerpo humano”, según se usa en la presente, no incluye anticuerpos donde se hayan injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como el ratón, en secuencias de regiones de marco humanas.

El término "anticuerpo humano recombinante", incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped (que se describirá más adelante en la Sección IIC), anticuerpos aislados a partir de una biblioteca combinatoria de anticuerpos humanos recombinantes (Hoogenboom, H. (1997) *Trends Biotechnol.* 15: 62-70; Azzazy y Highsmith (2002) *Clin. Biochem.* 35: 425-445; Gavilondo y Larrick (2000) *BioTechniques* 29: 128-145; Hoogenboom y Chames (2000) *Immunol., Today*, 21: 371-378), los anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulinas humanas (véanse, por ejemplo, Taylor et al., (1992) *Nucl. Acids Res.* 20: 6287-6295; Kellermann y Green (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 593-597; Little et al., (2000) *Immunol. Today* 21: 364-370) o los anticuerpos preparados, expresados o aislados por cualquier otro medio que comprenda cortar y empalmar secuencias de genes de inmunoglobulinas humanas para obtener otras secuencias de ADN. Estos anticuerpos humanos recombinantes tendrán regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la

línea germinal humana. Sin embargo, en determinadas formas de realización, estos anticuerpos humanos recombinantes son sometidos a una mutagénesis *in vitro* (o cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*), por lo que las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, si bien derivan y están relacionadas con secuencias VH y VL de la línea germinal, pueden no existir en el repertorio de anticuerpos de la línea germinal humana *in vivo* bajo condiciones naturales.

El término “anticuerpo quimérico” hace referencia a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y liviana de una especie y secuencias de la región constante de otra especie, tal como anticuerpos donde las regiones variables de la cadena pesada y liviana murinas están ligadas a regiones constantes humanas.

El término “anticuerpo con injerto de CDR” se refiere un anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de las cadenas pesada y liviana de una especie pero cuyas secuencias de una o más de las regiones CDR de las regiones VH y/o VL han sido reemplazadas por secuencias de CDR de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de las cadenas pesada y liviana humanas, en las cuales una o más de las CDR humanas (por ejemplo, CDR3) han sido reemplazadas por secuencias de CDR murinas, por ejemplo, obtenidas de un anticuerpo monoclonal de murino contra IL-1 α humana.

Según se usa en la presente, el término “CDR” hace referencia a la región determinante de complementariedad dentro de las secuencias variables de un

anticuerpo. Para cada una de las regiones variables, hay tres CDR en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena liviana, que se denominan CDR1, CDR2 y CDR3. El término "conjunto de CDR" según se usa en la presente se refiere al grupo de tres CDR que aparecen en una sola región variable (es decir, VH o VL) de un sitio de unión al antígeno. Los límites exactos de estas CDR han sido definidos en distintos términos de acuerdo con distintos sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat et al. (1987, 1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, Md.) no solamente provee un sistema de numeración no ambiguo de los residuos que puede aplicarse a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también provee límites precisos para los residuos que definen las tres CDR. Estas CDR pueden denominarse CDR Kabat. Chotia y colaboradores (Chotia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 y Chothia et al., 877-883) descubrieron que determinadas subporciones dentro de las CDR de Kabat adoptan conformaciones casi idénticas en sus esqueletos peptídicos, a pesar de que hay una gran diversidad a nivel de las secuencias de aminoácidos. Estas subporciones se denominaron L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3, donde "L" y "H" hacen referencia a las regiones de la cadena liviana y la cadena pesada, respectivamente. Estas regiones se pueden denominar CDR Chotia, y tienen límites que se superponen con las CDR Kabat. Otros límites que definen CDR superpuestas con las CDR de Kabat fueron descritos por Padlan et al., (1995) *FASEB J.* 9: 133-139 y MacCallum (1996) *J. Mol. Biol.* 262(5): 732-745). Otras definiciones de los límites de las CDR pueden no ser estrictamente acordes con los sistemas anteriores, pero aun así pueden

superponerse con las CDR de Kabat, aunque pueden estar acortadas o alargadas a la luz de las predicciones o los descubrimientos experimentales de que hay residuos o grupos de residuos particulares, o incluso CDR completas, que no afectan significativamente la unión al antígeno. En los métodos usados en la presente pueden emplearse CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque en algunas realizaciones se usan CDR definidas de acuerdo con Kabat o Chotia.

Los términos “numeración de Kabat”, “definición de Kabat” y “nomenclatura de Kabat” se usan indistintamente en la presente. Estos términos hacen referencia a un sistema para numerar los residuos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácidos en las regiones variables de las cadenas pesada y liviana de un anticuerpo o en una porción de unión al antígeno de éste (Kabat *et al.*, (1971) *Ann. NY Acad. Sci.* 190: 382-391 y, Kabat *et al.*, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Publicación del NIH N° 91-3242). Para la región variable de la cadena pesada, la región hipervariable se extiende entre las posiciones de los aminoácidos 31 y 35 para CDR1, entre las posiciones de los aminoácidos 50 y 65 para CDR2 y entre las posiciones de los aminoácidos 95 y 102 para CDR3. Para la región variable de la cadena liviana, la región hipervariable se extiende entre las posiciones de los aminoácidos 24 y 34 para CDR1, entre las posiciones de los aminoácidos 50 y 56 para CDR2 y entre las posiciones de los aminoácidos 89 y 97 para CDR3.

El crecimiento y el análisis de grandes bases de datos públicas de

secuencias de aminoácidos de las regiones variables pesada y liviana durante los últimos veinte años han permitido comprender los límites típicos entre las regiones del marco de trabajo (FR) y las secuencias de las CDR dentro de las secuencias de la región variable, lo que les permitió a los especialistas en el arte determinar con precisión las CDR de acuerdo con la numeración de Kabat, la numeración de Chotia u otros sistemas. Véase, por ejemplo, Martin, " Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains", en Kontermann y Dübel, eds., *Antibody Engineering* (Springer-Verlag, Berlín, 2001), capítulo 31, paginas 432-433. A continuación se provee un método útil para determinar las secuencias de aminoácidos de las CDR de Kabat dentro de las secuencias de aminoácidos de las regiones variable pesada (VH) y variable liviana (VL):

Para identificar una secuencia de aminoácidos de CDR-L1:

Comienza aproximadamente a 24 residuos de aminoácido desde el extremo amino terminal de la región VL;

El residuo anterior a la secuencia de CDR-L1 siempre es cisteína (C);

El residuo posterior a la secuencia de CDR-L1 siempre es un residuo triptofano (W), típicamente Trp-Tyr-Gln (W-Y-Q), pero también Trp-Leu-Gln (W-L-Q), Trp-Phe-Gln (W-F-Q) y Trp-Tyr-Leu (W-Y-L);

La longitud típicamente es de 10 a 17 residuos de aminoácidos.

Para identificar una secuencia de aminoácidos de CDR-L2:

Siempre comienza 16 residuos después del final de CDR-L1;

Los residuos anteriores a la secuencia de CDR-L2 generalmente son Ile-Tyr (I-Y), pero también Val-Tyr (V-Y), Ile-Lys (I-K) y Ile-Phe (I-F);

La longitud siempre es de 7 residuos de aminoácidos.

Para identificar una secuencia de aminoácidos de CDR-L3:

Siempre comienza 33 aminoácidos después del final de CDR-L2;

El residuo anterior a la secuencia de aminoácidos de CDR-L3 siempre es una cisteína (C);

Los residuos posteriores a la secuencia de CDR-L3 siempre son Phe-Gly-X-Gly (F-G-X-G) (SEQ ID N°:7), donde X es cualquier aminoácido;

La longitud típicamente es de 7 a 11 residuos de aminoácidos.

Para identificar una secuencia de aminoácidos de CDR-H1:

Comienza aproximadamente 31 residuos de aminoácido desde el extremo amino terminal de la región VH y siempre 9 residuos después de una cisteína (C);

Los residuos anteriores a la secuencia de CDR-H1 siempre son Cys-X-X-X-X-X-X-X (SEQ ID N°:151), donde X es cualquier aminoácido;

El residuo posterior a la secuencia de CDR-H1 siempre es un Trp (W), típicamente Trp-Val (W-V), pero también Trp-Ile (W-I) y Trp-Ala (W-A);

La longitud típicamente es de 5 a 7 residuos de aminoácidos.

Para identificar una secuencia de aminoácidos de CDR-H2:

Siempre comienza 15 residuos de aminoácidos después del final de CDR-H1;

Los residuos anteriores a la secuencia de CDR-H2 típicamente son Leu-Glu-Trp-Ile-Gly (L-E-W-I-G) (SEQ ID N°:8), pero también son posibles variaciones de los mismos;

Los residuos posteriores son Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-

Thr/Ser/Ile/Ala (K/R-L/I/V/F/T/A-T/S/I/A);

La longitud típicamente es de 16 a 19 residuos de aminoácidos.

Para identificar una secuencia de aminoácidos de CDR-H3:

Siempre comienza 33 residuos de aminoácido después del final de CDR-H2 y siempre 3 después de una cisteína (C)'

Los residuos anteriores a la secuencia de CDR-H3 siempre son Cys-X-X (C-X-X), donde X es cualquier aminoácido, típicamente Cys-Ala-Arg (C-A-R);

Los residuos posteriores a la secuencia de CDR-H3 siempre son Trp-Gly-X-Gly (W-G-X-G) (SEQ ID N°:9), donde X es cualquier aminoácido;

La longitud típicamente es de 3 a 25 residuos de aminoácidos.

Según se usan en la presente, los términos “aceptor” y “anticuerpo aceptor” hacen referencia al anticuerpo o la secuencia de ácido nucleico que proporciona o codifica al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, o 100% de las secuencias de aminoácidos de una o más de las regiones de marco. En algunas formas de realización, el término “aceptor” hace referencia a la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos del anticuerpo que proporciona o codifica las regiones constantes. En aun otra realización, el término “aceptor” hace referencia a la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos del anticuerpo que proporciona o codifica una o más de las regiones de marco y las regiones constantes. En una realización específica, el término “aceptor” hace referencia a una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos de un anticuerpo que proporciona o codifica al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, o 100% de las secuencias de aminoácidos de una o más de

las regiones de marco. De acuerdo con esta realización, un aceptor puede contener al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos 10 residuos de aminoácidos que no aparecen en una o más posiciones específicas de un anticuerpo humano. Una región de marco de trabajo aceptora y/o una región constante aceptora, por ejemplo, puede derivar o puede obtenerse a partir de un anticuerpo de la línea germinal, un gen de un anticuerpo maduro, un anticuerpo funcional (por ejemplo, anticuerpos bien conocidos en el arte, anticuerpos en desarrollo, o anticuerpos disponibles comercialmente).

Según se usa en la presente, el término residuo “canónico” hace referencia a un residuo en una CDR o un marco que define una estructura canónica de CDR particular, como lo definen Chotia et al., (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 y Chothia et al., (1992) *J. Mol. Biol.* 227: 799-817). De acuerdo con Chotia et al., las porciones críticas de las CDR de muchos anticuerpos tienen conformaciones del esqueleto peptídico casi idénticas, a pesar de su gran diversidad a nivel de la secuencia de aminoácidos. Cada estructura canónica especifica principalmente un conjunto de ángulos de torsión del esqueleto peptídico para un segmento contiguo de residuos de aminoácidos que forman un bucle.

Según se usan en la presente, los términos “donante” y “anticuerpo donante” hacen referencia a un anticuerpo que proporciona una o más CDR. En una realización, el anticuerpo donante es un anticuerpo de una especie diferente del anticuerpo del que se obtienen o derivan las regiones de marco. En el contexto de un anticuerpo humanizado, el término “anticuerpo donante” hace referencia a un anticuerpo no humano que proporciona una o más CDR.

Según se usa en la presente, el término “marco” o “secuencia de marco” hace referencia a las secuencias restantes de una región variable menos las CDR. Dado que la definición exacta de una secuencia CDR se puede determinar usando distintos sistemas, el significado de una secuencia de marco de trabajo está sujeto a interpretaciones correspondientemente diferentes. Las seis CDR (CDR-L1, L2 y L3 de la cadena liviana y CDR-H1, H2 y H3 de la cadena pesada) también dividen las regiones de marco de trabajo en la cadena liviana y en la cadena pesada en cuatro subregiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, donde CDR1 está localizada entre FR1 y FR2, CDR2 está localizada entre FR2 y FR3 y CDR3 está localizada entre FR3 y FR4. Sin especificar las subregiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región de marco, tal como la han definido otros, representa las FR combinadas en la región variable de una sola cadena de inmunoglobulina natural. Según se usa en la presente, una FR representa una de las cuatro subregiones, y las FR representan dos o más de las cuatro subregiones que constituyen una región de marco.

Las secuencias aceptoras de la cadena pesada y la cadena liviana humanas son conocidas en el arte. En una realización de la invención, las secuencias aceptoras de la cadena pesada y la cadena liviana humanas se seleccionan entre las secuencias que se describen en la Tabla 3 y la Tabla 4.

Tabla 3: Secuencias aceptoras de la cadena pesada

SEQ	Región proteica	Secuencia
ID N°		

		123456789012345678901234567 890
10	<u>VH2-70/JH6 FR1</u>	EVTLRESGPALVKPTQTLTLTCT FSGFSLS
11	VH2-70/JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLA
12	VH2-70/JH6 FR3	RLTISKDTSKNQVVLTMNMDP VDTATYYC AR
13	VH2-70/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
14	VH2-26/JH6 FR1	EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCT VSGFSLS
15	VH2-26/JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLA
16	VH2-26/JH6 FR3	RLTISKDTSKSQVVLTMNMDPV DTATYYC AR
17	VH2-26/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
18	VH3-72/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFS
19	VH3-72/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVG
20	VH3-72/JH6 FR3	RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTE DTAVYYC AR

21	VH3-72/JH6 FR4	WGQGTDTVTVSS
22	VH3-21/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSC AASGFTFS
23	VH3-21/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
24	VH3-21/JH6 FR3	RFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYC AR
25	VH3-21/JH6 FR4	WGQGTDTVTVSS
26	VH1-69/JH6 FR1	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFS
27	VH1-69/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
28	VH1-69/JH6 FR3	RVTITADKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYC AR
29	VH1-69/JH6 FR4	WGQGTDTVTVSS
30	VH1-18/JH6 FR1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFT
31	VH1-18/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
32	VH1-18/JH6 FR3	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYC AR
33	VH1-18/JH6 FR4	WGQGTDTVTVSS

34	<u>VH7-4.1/JH6 FR1</u>	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSC KASGYTFT
35	<u>VH7-4.1/JH6 FR2</u>	WVRQAPGQGLEWMG
36	<u>VH7-4.1/JH6 FR3</u>	RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAE DTAVYYC AR
37	<u>VH7-4.1/JH6 FR4</u>	WGQGTTVTVSS

Tabla 4: Secuenciasceptoras de la cadena liviana

SEQ ID Nº	Región proteica	Secuencia
		123456789012345678901234567 890
38	<u>B3/JK4 FR1</u>	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC
39	B3/JK4 FR2	WYQQKPGQPPKLLIY
40	B3/JK4 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQ AEDVAVYYC
41	B3/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
42	L2/JK4 FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
43	L2/JK4 FR2	WYQQKPGQAPRLLIY
44	L2/JK4 FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQS EDFAVYYC

45	L2/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
46	L15/JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC
47	L15/JK4 FR2	WYQQKPEKAPKSLIY
48	L15/JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYC
49	L15/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
50	L5/JK4 FR1	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITC
51	L5/JK4 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
52	L5/JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYC
53	L5/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
54	<u>1-33/018/JK2 FR1</u>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC
55	1-33/018/JK2 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
56	1-33/018/JK2 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQ PEDIATYYC
57	1-33/018/JK2 FR4	FGQGTKLEIKR
58	1-33/018/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR

Según se usa en la presente, el término "gen de anticuerpo de la línea germinal" o "fragmento de gen" hace referencia a una secuencia de inmunoglobulina codificada por células no linfoides que no han sufrido el proceso de maduración que conduce a un reordenamiento genético y mutación para la expresión de una inmunoglobulina particular. (véase, por ejemplo., Shapiro et al.,

(2002) *Crit. Rev. Immunol.*, 22(3): 183-200; Marchalonis et al., (2001) *Adv. Exp. Med. Biol.* 484: 13-30). Una de las ventajas proporcionadas por las diversas formas de realización de la presente invención deriva del descubrimiento de que los genes de anticuerpos de la línea germinal tienen mayores probabilidades que los genes de genes maduros de conservar estructuras esenciales en su secuencia de aminoácidos que son propias de los individuos de la especie, por lo que es menos probable que sean reconocidos como extraños cuando se los use con fines terapéuticos en dicha especie.

Según se usa en la presente, el término residuos “clave” hace referencia a determinados residuos dentro de la región variable que tienen un impacto mayor sobre la especificidad y/o la afinidad de unión de un anticuerpo, en particular, un anticuerpo humanizado. Un residuo clave incluye, sin que esto constituya limitación alguna, uno o más de los siguientes: un residuo que se halla adyacente a una CDR, un sitio de glicosilación potencial (puede ser un sitio de N u O-glicosilación), un residuo raro, un residuo capaz de interactuar con el antígeno, un residuo capaz de interactuar con una CDR, un residuo canónico, un residuo de contacto entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena liviana, un residuo en la zona de Vernier, y un residuo en una región donde se superpone una CDR1 de cadena pesada definida por Chotia y un marco de la primera cadena pesada definida por Kabat.

El término “anticuerpo humanizado” hace referencia a anticuerpos que contienen secuencias de la región variable de las cadenas pesada y liviana de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, pollo, camélidos, ovejas o

cabras), pero donde al menos una parte de la secuencia VH y/o VL ha sido alterada para que sean más “similares a humanos”, es decir, para que sean más similares a las secuencias variables de la línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo con una CDR injertada donde las secuencias CDR no humanas han sido insertadas en secuencias VH y VL humanas para reemplazar las secuencias de marcos de trabajo (FR) no humanas correspondientes. Por ejemplo, un “anticuerpo humanizado” es un anticuerpo, o una variante, un derivado, un análogo o un fragmento de éste, que se une de forma inespecífica a un antígeno de interés, y que comprende una región de marco (FR) que sustancialmente tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y una región de determinación de la complementariedad (CDR) que sustancialmente tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. Según se usa en la presente, el término “sustancialmente”, en el contexto de una CDR, hace referencia a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la CDR de un anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv), donde la totalidad o sustancialmente todas las regiones de CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana (es decir, el anticuerpo donante), y la totalidad o sustancialmente todas las regiones de marco son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. En una forma de realización, un anticuerpo humanizado también

comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. En algunas formas de realización, un anticuerpo humanizado contiene la cadena liviana y al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. En algunas formas de realización, un anticuerpo humanizado solamente contiene una cadena liviana humanizada. En algunas formas de realización, un anticuerpo humanizado solamente contiene una cadena pesada humanizada. En formas de realización específicas, un anticuerpo humanizado solamente contiene un dominio variable humanizado de una cadena liviana y/o una cadena pesada humanizada.

El anticuerpo humanizado se puede seleccionar entre cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo en un sentido no taxativo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y los dominios constantes particulares pueden seleccionarse con el fin de optimizar las funciones efectoras deseadas usando procedimientos bien conocidos en el arte.

No es necesario que las regiones de marco y CDR de un anticuerpo humanizado correspondan con precisión a las secuencias progenitoras; por ejemplo, la CDR del anticuerpo donante o el marco consenso puede haber sido mutada mediante la sustitución, la inserción y/o la supresión de al menos un residuo de aminoácido, de modo que el residuo de la CDR o el marco en dicho sitio no corresponde al anticuerpo donante o al marco consenso. Sin embargo, en una realización, estas mutaciones no son extensas. Comúnmente, al menos 80%,

al menos 85%, al menos 90%, y al menos 95% de los residuos del anticuerpo humanizado corresponderán a los de las secuencias de las FR y CDR progenitoras. Según se usa en la presente, el término “marco de trabajo consenso” hace referencia a la región del marco de trabajo en la secuencia de la inmunoglobulina consenso. Según se usa en la presente, el término “secuencia de inmunoglobulina consenso” hace referencia a la secuencia formada con los aminoácidos de ocurrencia más frecuente (o nucleótidos) en una familia de secuencias de inmunoglobulina relacionadas (véase, por ejemplo, Winnaker (1987) *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania). Por consiguiente una "secuencia de inmunoglobulina consenso" puede comprender un "dominio variable consenso" y/o un "dominio constante consenso". A su vez, un "dominio variable consenso" puede comprender una o más "regiones de marco de trabajo consenso" y/o una o más "CDR consenso". En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido que aparece con mayor frecuencia en dicha posición en la familia. Cuando dos aminoácidos aparecen con igual frecuencia, cualquiera de ellos puede incluirse en la secuencia consenso.

Según se usa en la presente, la zona “Vernier” hace referencia a un subconjunto de residuos del marco que pueden ajustar la estructura de la CDR y ajustarla con precisión para que se una al antígeno como lo describen Foote y Winter (1992, *J. Mol. Biol.* 224: 487-499). Los residuos de la zona Vernier forman una capa que queda debajo de las CDR, y pueden afectar la estructura de las CDR y la afinidad del anticuerpo.

En esta memoria descriptiva se usa el término "proteína de unión multivalente" para hacer referencia a una proteína de unión que comprende dos o más sitios de unión a antígeno. La proteína de unión multivalente se diseña para que tenga tres o más sitios de unión a antígeno, y generalmente no es un anticuerpo de origen natural. El término "proteína de unión multiespecífica" hace referencia a una proteína de unión con la capacidad de unir dos o más blancos relacionados o no relacionados. Las proteínas de unión de dominio variable doble (DVD) son proteínas de unión que comprenden dos o más sitios de unión al antígeno, y son proteínas de unión tetravalentes o multivalentes. Dichas proteínas de unión a DVD pueden ser monoespecíficas, es decir, capaces de unirse a un antígeno, o multiespecíficas, es decir, capaces de unirse a dos o más antígenos. Las proteínas de unión DVD que comprenden dos polipéptidos DVD de cadena pesada y dos polipéptidos DVD de cadena liviana se conocen como una molécula de DVD-IgTM. Cada mitad de una molécula de DVD-IgTM comprende un polipéptido DVD de cadena pesada, y un polipéptido DVD de cadena liviana, y dos sitios de unión al antígeno. Cada sitio de unión comprende un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena liviana, con la participación de un total de 6 CDR en la unión al antígeno por sitio de unión al antígeno. Las proteínas de unión DVD, y los métodos para preparar las proteínas de unión DVD, se divulgan en la Patente de los EE.UU. N°: 7.612.181.

Un aspecto de la invención se relaciona con una proteína de unión DVD que comprende proteínas de unión con capacidad de unirse a IL-1 α . En otro aspecto, la proteína de unión DVD tiene la capacidad de unirse a la IL-1 α y a un

segundo blanco. En una forma de realización, la proteína de unión DVD tiene la capacidad de unirse a la IL-1 α y a la IL-1 β .

El término "neutralizante" se refiere a la neutralización de la actividad biológica de una citoquina cuando una proteína de unión se une específicamente a la citoquina. Preferentemente, una proteína de unión neutralizante es un anticuerpo neutralizante cuya unión a la hIL-1 α da como resultado la inhibición de una actividad biológica de la hIL-1 α . En una forma de realización, la proteína de unión neutralizante se une a la hIL-1 α y reduce una actividad biológica de la hIL-1 α en por lo menos aproximadamente un 20%, al menos aproximadamente un 40%, al menos aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95% o al menos aproximadamente un 100%. La inhibición de una actividad biológica de hIL-1 α por una proteína de unión neutralizante se puede evaluar midiendo uno o más indicadores de la actividad biológica de hIL-1 α bien conocidos en el arte.

El término "epitope" incluye cualquier determinante polipeptídico capaz de unirse específicamente a un receptor de célula T o inmunoglobulina. En determinadas formas de realización, los epitopes determinantes incluyen agrupaciones superficiales de moléculas con actividad química, tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, fosforilos o sulfonilos, y en determinadas formas de realización, pueden tener características específicas en su estructura tridimensional y/o características de carga específicas. Un epitope es una región de un antígeno donde se une un anticuerpo. Un epitope consiste

entonces de los residuos de aminoácido de una región de un antígeno (o fragmento del mismo) conocido por unirse al sitio complementario sobre el miembro de unión específico. Un fragmento antigénico puede contener más de un epítopo. En determinadas formas de realización, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce su antígeno blanco en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. Se dice que los anticuerpos se “unen al mismo epítopo” si los anticuerpos compiten (uno evita la unión o modula el efecto del otro). Además, las definiciones estructurales de los epítopos (superpuestos, similares, idénticos) son informativas, pero las definiciones funcionales comúnmente son más relevantes, ya que incluyen parámetros estructurales (de unión) y funcionales (modulación, competición).

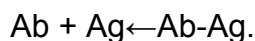
El término “resonancia de plasmón superficial”, hace referencia a un fenómeno óptico que permite analizar las interacciones bioespecíficas a tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas en una matriz biosensora, por ejemplo, usando el sistema BIACORE™ (Biacore International AB, una compañía de GE Healthcare, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para consultar descripciones adicionales, véanse Jönsson, U., *et al.* (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jönsson, U., *et al.* (1991) *BioTechniques* 11: 620-627; Johnsson, B. *et al.*, (1995) *J. Mol. Recognit.* 8: 125-131; y Johnsson, B. *et al.*, (1991) *Anal. Biochem.* 198: 268-277.

El término “ K_{on} ” hace referencia a la constante de activación para la asociación de una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo) con el antígeno, para formar, por ejemplo, el complejo de anticuerpo/antígeno, como es conocido

en el arte. La " K_{on} " también se conoce como "constante de velocidad de asociación", o " k_a ", términos que se usan indistintamente en la presente. Este valor, que indica la velocidad de unión de un anticuerpo con su antígeno blanco, o la velocidad de formación de un complejo entre un anticuerpo y el antígeno, también se puede obtener de acuerdo con la ecuación:



El término " K_{off} " hace referencia a la constante de desactivación para la disociación de una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo), por ejemplo, del complejo de anticuerpo/antígeno, como es conocido en el arte. La " K_{off} " también se conoce con los términos "constante de velocidad de disociación", o " k_d ", que se usan indistintamente en la presente. Este valor indica la velocidad de disociación de un anticuerpo de su antígeno blanco o la separación del complejo Ab-Ag en el tiempo en el anticuerpo y antígeno libres según se muestra en la siguiente ecuación:



Los términos "constante de disociación en el equilibrio" o " K_D ", usados indistintamente en la presente, hacen referencia al valor obtenido en una medición de titulación en el equilibrio, o a la división de la constante de la velocidad de disociación (K_{off}) por la constante de la velocidad de asociación (K_{on}). La constante de velocidad de asociación, la constante de velocidad de disociación y la constante de disociación en equilibrio se usan para representar la afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno. Los métodos para determinar las constantes de asociación y disociación son bien conocidos en el arte. El uso de

técnicas basadas en fluorescencia ofrece una sensibilidad elevada y la capacidad de examinar muestras en amortiguadores fisiológicos en equilibrio. Se pueden usar otros enfoques e instrumentos experimentales, tales como el ensayo BIACORE™ (análisis de interacción biomolecular), por ejemplo, los instrumentos disponibles en BIAcore International AB, una compañía de GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Adicionalmente, también se puede usar un ensayo KinExA® (ensayo de exclusión cinética), disponible en Sapidyne Instruments (Boise, Idaho).

El término "proteína de unión marcada", según se usa en la presente, se refiere a una proteína con una marca incorporada que permite identificar la proteína de unión. En un aspecto, la marca es una marca detectable, por ejemplo, la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la unión de porciones biotiniladas a un polipéptido, donde dichas porciones pueden ser detectadas por avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o una actividad enzimática que puede ser detectada por medios métodos ópticos o colorimétricos). Los ejemplos de marcas para polipéptidos incluyen, pero en un sentido no taxativo, los que se indicarán a continuación: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{11}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho y ^{153}Sm); marcas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, lantánido-fósforos), marcas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, luciferasa, fosfatasa alcalina); marcadores quimioluminiscentes; grupos de biotinito; epitopes de polipéptidos predeterminados que son reconocidos por un informante secundario (por ejemplo, secuencias de cierre [*zipper*] de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, marcas de

epitope); y agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio.

El término "conjugado de anticuerpo" se refiere a una proteína de unión, tal como un anticuerpo, ligado químicamente a un segundo grupo químico, tal como un agente terapéutico o citotóxico. El término "agente" se usa en la presente para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto obtenido a partir de materiales biológicos. En un aspecto, los agentes terapéuticos o citotóxicos incluyen, pero en un sentido no taxativo, toxina de Pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de los mismos.

Los términos "cristal" y "cristalizado" hacen referencia a un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo que existe en la forma de un cristal. Los cristales son una forma de materia en estado sólido que es diferente de otras formas, tales como el estado sólido amorfo o el estado líquido cristalino. Los cristales están compuestos por disposiciones de átomos, iones o moléculas tridimensionales, repetitivas y regulares (por ejemplo, proteínas, tales como anticuerpos), o ensamblajes moleculares (por ejemplo, complejos de antígenos/anticuerpos). Estas disposiciones tridimensionales siguen relaciones matemáticas bien comprendidas en este campo. La unidad fundamental, o bloque de construcción, que se repite en un cristal, se denomina unidad asimétrica. La

repetición de la unidad asimétrica en una disposición que satisface una simetría cristalográfica dada y bien definida provee la “celda individual” del cristal. La repetición de la célula individual por repeticiones regulares en las tres dimensiones provee el cristal. Véase Giegé y Ducruix (1999) capítulo 1, en *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2ª edición (Ducruix y Giegé, editores) (Oxford University Press, Nueva York, 1999) pp. 1-16.

El término “polinucleótido” hace referencia a una forma polimérica de dos o más nucleótidos, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos, o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de ADN o ARN de cadena simple y doble, pero en una realización es ADN de cadena doble.

El término “polinucleótido aislado” se refiere a un polinucleótido (por ejemplo, de origen genómico, de ADNc o sintético, o una combinación de los mismos) que no está asociado con todo o una porción de un polinucleótido con el cual está asociado en la naturaleza, con el cual está ligado operativamente en la naturaleza, o con el cual aparece en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

El término “vector” hace referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que está unido. Un tipo de vector es un “plásmido”, que designa un bucle de ADN circular de cadena doble con el que pueden unirse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, que permite unir segmentos de ADN adicionales al genoma viral. Determinados vectores tienen la capacidad de una replicación autónoma en la célula huésped en la cual fueron introducidos (por ejemplo, los vectores

bacterianos con un origen de replicación bacteriano y los vectores episómicos de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped al introducirse en ella, por lo que se replican junto con el genoma del huésped. Más aun, determinados vectores pueden dirigir la expresión de los genes a los cuales están ligados operativamente. Estos vectores se conocen en la presente como “vectores de expresión recombinante” (o simplemente “vectores de expresión”). En general, los vectores de expresión de utilidad con las técnicas de ADN recombinante comúnmente se encuentran en la forma de plásmidos. En esta solicitud, “plásmido” y “vector” se pueden usar indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector de uso más común. Sin embargo, la invención pretende incluir estas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno-asociados), que tienen funciones equivalentes.

El término "ligado operativamente" se refiere a la ubicación de los componentes de manera tal que funcionan de la manera pretendida. Una secuencia control “ligada operativamente” a una secuencia codificante está ligada de modo tal que la expresión de la secuencia codificante se obtiene bajo condiciones compatibles con las secuencias control. Las secuencias "ligadas operativamente" incluyen secuencias de control de la expresión que son contiguas de un ácido nucleico de interés, secuencias de control de la expresión que actúan *in trans*, es decir, están ubicadas sobre una molécula de ácido nucleico diferente que un ácido nucleico de interés pero que no obstante ejercen control sobre el

ácido nucleico de interés y secuencias de control de la expresión que están ubicadas sobre la misma molécula de ácido nucleico, pero a una cierta distancia, de un ácido nucleico de interés. El término “secuencia de control de la expresión”, según se usa en la presente, hace referencia a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para obtener la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que están unidas. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias apropiadas para el inicio de la transcripción, la terminación, secuencias promotoras y potenciadoras; señales eficaces para el procesamiento del ARN, tales como secuencias de separación y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que mejoran la eficiencia de la traducción (es decir, la secuencia consenso Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de las proteínas; y cuando se lo desea, secuencias que mejoran la secreción de las proteínas. La naturaleza de estas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped. En procariotas, estas secuencias de control generalmente incluyen promotores, sitios de unión a ribosomas y secuencias de terminación de la transcripción. En eucariotas, en general, estas secuencias de control incluyen promotores y secuencias de terminación de la transcripción. El término “secuencias de control” incluye componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias directrices y secuencias que son asociados de fusión.

La “transformación” hace referencia a cualquier proceso con el cual el ADN exógeno ingresa en una célula huésped. La transformación puede tener lugar

bajo condiciones naturales o artificiales, usando diversos métodos bien conocidos en el arte para insertar secuencias de ácidos nucleicos extrañas en una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo. El método se selecciona sobre la base de la célula huésped a transformar, y puede incluir, pero en un sentido no limitativo, infección viral, electroporación, lipofección y bombardeo de partículas. Estas células “transformadas” incluyen células transformadas de forma estable, donde el ADN insertado puede replicarse como un plásmido de replicación autónoma o como parte del cromosoma del huésped. También incluyen células que expresan de forma transitoria el ADN o el ARN insertado por períodos de tiempo limitados.

El término “célula huésped recombinante” (o simplemente “célula huésped”), según se usa en la presente, hace referencia a la célula en la que se introduce ADN exógeno. Estos términos hacen referencia no solamente a la célula específica en cuestión, sino a la progenie de dicha célula. Dado que es posible que se produzcan modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, de hecho, esta progenie puede no ser idéntica a la célula parental, pero aún se incluye dentro del término “célula huésped”, según se usa en la presente. En un aspecto, las células huésped incluyen células procariotas y eucariotas seleccionadas entre cualquiera de los reinos de la vida. Las células eucariotas incluyen células protistas, fúngicas, vegetales y animales. En otro aspecto, las células huésped incluyen, pero en un sentido no taxativo, células procariotas de la línea de *E. coli*; las líneas de células de mamíferos CHO, HEK 293 y COS; la línea de células de insecto Sf9; y la célula

fúngica *Saccharomyces cerevisiae*.

Se pueden emplear técnicas convencionales para la síntesis de ADN recombinante y oligonucleótidos, y para cultivo y la transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación y lipofección). Las reacciones enzimáticas y los procedimientos de purificación se pueden llevar a cabo de acuerdo con las especificaciones de los proveedores, de maneras conocidas en el arte o como se describe en la presente. Las técnicas y los procedimientos mencionados generalmente pueden ponerse en práctica de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en el arte, y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se describen en toda la memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 1989).

El término “organismo transgénico” hace referencia a un organismo que tiene células que contienen un transgen, donde el transgen introducido en el organismo (o cualquier ancestro del organismo) expresa un polipéptido que no se expresa naturalmente en el organismo. Un “transgen” es una construcción de ADN que se integra de forma estable y operativa en el genoma de una célula a partir de la que se desarrolla un organismo transgénico, donde dirige la expresión de un producto génico codificado en uno o más tipos celulares o tejidos del organismo transgénico.

Los términos "regular" y "modular" se utilizan indistintamente y se refieren a un cambio o una alteración en la actividad de una molécula de interés (por

ejemplo, la actividad biológica de la hIL-1 α). La modulación puede ser un incremento o una disminución en la magnitud de una actividad o una función determinada de la molécula de interés. Los ejemplos de actividades y funciones de una molécula incluyen, pero en un sentido no taxativo, características de unión, actividad enzimática, activación de receptores celulares y transducción de señales.

Correspondientemente, el término “modulador” hace referencia a un compuesto capaz de cambiar o alterar una actividad o una función de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de la hIL-1 α). Por ejemplo, un modulador puede provocar un incremento o una disminución en la magnitud de una actividad o una función determinada de una molécula, en comparación con la magnitud de la actividad o la función observada en ausencia del modulador. En determinadas formas de realización, un modulador es un inhibidor que reduce la magnitud de al menos una actividad o una función de una molécula. Los ejemplos de inhibidores incluyen, pero en un sentido no limitativo, proteínas, péptidos, anticuerpos, peptidocuerpos [*peptibodies*], hidratos de carbono o pequeñas moléculas orgánicas. Los peptidocuerpos se describen, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud Internacional N°: WO 01/83525.

El término “agonista” hace referencia a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés, provoca un incremento en la magnitud de una actividad o una función determinada, en comparación con la magnitud de la actividad o la función observada en ausencia del agonista. Los agonistas particulares de interés pueden incluir, pero en un sentido no taxativo, un

polipéptido, un ácido nucleico, un hidrato de carbono o cualquier otra molécula que se una a la IL-1 α y/o a la IL-1 β .

Los términos “antagonista” o “inhibidor” hacen referencia a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés, provoca una disminución en la magnitud de una actividad o una función determinada, en comparación con la magnitud de la actividad o la función observada en ausencia del antagonista. Los antagonistas incluyen aquellos que bloquean o modulan la actividad biológica o inmunológica de la IL-1 α y/o la IL-1 β . Los antagonistas y los inhibidores de la IL-1 α pueden incluir, pero en un sentido no taxativo, un polipéptido, un ácido nucleico, un hidrato de carbono o cualquier otra molécula que se una a la IL-1 α . Los antagonistas y los inhibidores de la IL-1 β pueden incluir, pero en un sentido no taxativo, un polipéptido, un ácido nucleico, un hidrato de carbono o cualquier otra molécula que se una a la IL-1 β .

El término “cantidad eficaz” hace referencia a la cantidad de una terapia que es suficiente para reducir o mejorar la severidad y/o la duración de un trastorno o uno o más de sus síntomas, prevenir el avance de un trastorno, provocar la regresión de un trastorno, prevenir la recurrencia, el desarrollo, el inicio o la progresión de uno o más síntomas asociados con un trastorno, detectar un trastorno, o potenciar o mejorar el o los efectos profilácticos o terapéuticos de otra terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico).

El término “muestra” se usa en su sentido más amplio. Una “muestra biológica” incluye, pero en un sentido no taxativo, una cantidad de una sustancia de un organismo vivo o un organismo que estuvo vivo. Estos organismos vivos

incluyen, pero en un sentido no taxativo, seres humanos, ratones, ratas, monos, perros, conejos y otros animales. Estas sustancias incluyen, pero en un sentido no taxativo, sangre, suero, orina, fluido sinovial, células, órganos, tejidos, médula ósea, nódulos linfáticos y bazo.

Un anticuerpo “madurado por afinidad” es un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más de sus CDR o marcos de trabajo, alteraciones que pueden resultar en una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con la afinidad del anticuerpo parental, que no posee dichas alteraciones. Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades por el antígeno blanco en el orden nanomolar o aún picomolar. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen con procedimientos conocidos en el arte. En Marks et al., (1992) *BioTechnology* 10: 779-783 (1992) se describe la maduración por afinidad mediante el entremezclado de dominios VH y VL. La mutagénesis al azar de residuos de la CDR y/o el marco se describe en Barbas et al., (1994) *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91: 3809-3813; Schier et al., (1995) *Gene* 169: 147-155; Yelton et al., (1995) *J. Immunol.*, 155: 1994-2004; Jackson et al., (1995) *J. Immunol.*, **154**(7): 3310-3319; y Hawkins et al., (*J. Mol. Biol.*, 226: 889-896.

El dolor que persiste en un individuo después de haber desaparecido la causa inicial del dolor ya no es un síntoma sino una enfermedad reconocida por sí misma. El término "alodinia", según se usa en la presente, se refiere a una condición en la cual un individuo experimenta una respuesta dolorosa frente a un estímulo normalmente inocuo, típicamente de naturaleza mecánica, tal como el

cepillado de la piel. El dolor alodínico no comprende nociceptores y por ello también se le denomina dolor "no nociceptivo". El término "hiperalgesia", según se usa en la presente, se refiere a una condición en la cual un individuo tiene una mayor sensibilidad al dolor debido a un estímulo nocivo, en especial un estímulo que activa a los nociceptores, tal como un estímulo mecánico, térmico o químico doloroso. Un estímulo que activa a los nociceptores causa dolor. La hiperalgesia es una condición en la cual un individuo presenta una mayor respuesta de dolor a un estímulo normalmente nocivo. Un individuo puede sufrir de alodinia, hiperalgesia o una combinación de alodinia e hiperalgesia.

I. Generación de proteínas de unión DVD-Ig™ que se unen a la IL-1 α y a la IL-1 β

El diseño y la producción de proteínas de unión del dominio variable dual de inmunoglobulina (DVD-Ig™) capaces de unirse a uno o más antígenos blanco (o epitopes) ya fueron descritos (véase, por ejemplo, la publicación PCT N°: WO 2007/024715). Una proteína de unión DVD-Ig de utilidad en los métodos y las composiciones que se describen en la presente para tratar osteoartritis se une a la IL-1 α y a la IL-1 β . En una forma de realización, una proteína de unión DVD-Ig™ comprende por lo menos dos cadenas polipeptídicas, en donde la primera cadena polipeptídica comprende VD1-(X1) n -VD2-C-(X2) n , en donde VD1 es un primer dominio variable de la cadena pesada, VD2 es un segundo dominio variable de la cadena pesada, C es un dominio constante de la cadena pesada, X1 es un conector con la condición de que no es CH1, y X2 es una región Fc; y en donde dicha segunda cadena polipeptídica comprende VD1-(X1) n -VD2-C-(X2) n , en

donde VD1 es un primer dominio variable de la cadena liviana, VD2 es un segundo dominio variable de la cadena liviana, C es un dominio constante de cadena liviana, X1 es un conector con la condición de que no es CH1, y X2 no comprende una región Fc; y n es 0 ó 1. Una proteína de unión DVD-Ig™ que consiste de la primera y la segunda cadenas polipeptídicas tiene dos sitios de unión al antígeno.

En otra forma de realización, una proteína de unión DVD-Ig™ comprende cuatro cadenas polipeptídicas, en donde cada una de las dos primeras cadenas polipeptídicas comprende VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n, respectivamente, en donde VD1 es un primer dominio variable de la cadena pesada, VD2 es un segundo dominio variable de la cadena pesada, C es un dominio constante de la cadena pesada, X1 es un conector con la condición que no sea CH1 y X2 es una región Fc; y cada una de las dos segundas cadenas polipeptídicas comprende VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n, respectivamente,, en donde VD1 es un primer dominio variable de la cadena liviana, VD2 es un segundo dominio variable de la cadena liviana, C es un dominio constante de la cadena liviana, X1 es un conector con la condición que no sea CH1 y X2 no comprende una región Fc; y n es 0 ó 1. Dicha proteína de unión DVD-Ig™ tiene cuatro sitios de unión al antígeno.

A modo de ejemplo, una proteína de unión DVD-Ig de utilidad en los métodos y las composiciones que se describen en la presente para tratar osteoartritis en un individuo puede ser manipulada para tener un sitio de unión para la IL-1β formada por la asociación de los dominios variables VD1 de las dos (primero y segundo) polipéptidos y un sitio de unión para la IL-1α formado por la

asociación de los dominios variables VD2 de los dos (primero y segundo) polipéptidos. En un ordenamiento alternativo, una proteína de unión DVD-Ig de utilidad en los métodos y las composiciones que se describen en la presente para tratar osteoartritis en un individuo puede tener un sitio de unión para la IL-1 α formada por la asociación de los dominios variables VD1 de los dos (primero y segundo) polipéptidos y un sitio de unión para la IL-1 β formada por la asociación de los dominios variables VD2 de los dos (primero y segundo) polipéptidos.

A. Generación de anticuerpos monoclonales parentales

Los dominios variables de la proteína de unión DVD se pueden obtener a partir de anticuerpos parentales, incluyendo anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales capaces de unirse a los antígenos de interés. Estos anticuerpos pueden ser naturales o se pueden generar mediante tecnología recombinante.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando una amplia variedad de procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de éstas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando procedimientos con hibridomas, incluyen los que son conocidas en la técnica y los que se detallan, por ejemplo, en Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, 2^a ed., (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988); Hammerling, et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* (Elsevier, N.Y., 1981), páginas 563-581 (dichas referencias se incorporan por completo a modo de referencia). El término “anticuerpo monoclonal” (abreviado como “mAb”), según se usa en la presente, no se limita a los anticuerpos

producidos con tecnología de hibridomas. El término “anticuerpo monoclonal” hace referencia a un anticuerpo que deriva de un clon individual, que incluye cualquier clon eucariota, procariota o de fago, y no al método con el que se lo produce. Los hibridomas se seleccionan, se clonan y son sometidos a un análisis adicional para determinar la presencia de características deseables, incluyendo un crecimiento robusto del hibridoma, una producción elevada de anticuerpos y la presencia de características deseables de dichos anticuerpos usando métodos estándar. Los hibridomas se pueden cultivar y expandir *in vivo* en animales singeneicos, en animales que carecen de sistema inmune, por ejemplo, ratones desnudos, o en un cultivo celular *in vitro*. Los métodos para seleccionar, clonar y expandir hibridomas son bien conocidos por los especialistas en la técnica. En una forma de realización preferida, los hibridomas son hibridomas de ratón. En otra forma de realización, los hibridomas se producen en un animal no humano, en una especie distinta de ratón, tal como rata, oveja, cerdo, ganado bovino o caballo. En otra forma de realización, los hibridomas son hibridomas humanos, donde se fusiona un mieloma humano no secretor con una célula humana donde se expresa un anticuerpo capaz de unirse a un antígeno específico deseado, tal como IL-1 α o IL-1 β .

También se generan anticuerpos monoclonales recombinantes a partir de linfocitos individuales aislados usando un procedimiento conocido en el arte como el método de anticuerpos con linfocitos seleccionados (SLAM), como se describe en la Patente de los EE.UU. N°: 5.627.052, la publicación PCT WO 92/02551 y Babcock, J.S. *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7843-7848. En este

método, se identifican células individuales que secretan los anticuerpos de interés, por ejemplo, linfocitos derivados de un animal inmunizados, se rescatan ADNc de las regiones variables de las cadenas pesada y liviana de las células por PCR con transcriptasa inversa, y luego se expresan estas regiones variables en el contexto de regiones constantes de inmunoglobulinas apropiadas (por ejemplo, regiones constantes humanas), en células huésped de mamíferos, tales como células COS o CHO. Después, las células huésped transfectadas con las secuencias de inmunoglobulinas amplificadas, derivadas de linfocitos seleccionados *in vivo*, pueden someterse a otros procedimientos de análisis y selección *in vitro*, por ejemplo, analizando las células transfectadas para aislar aquellas células que expresan anticuerpos contra el antígeno de interés. Las secuencias de inmunoglobulinas amplificadas pueden someterse a manipulaciones adicionales *in vitro*, por ejemplo, con métodos de maduración por afinidad *in vitro* como los que se describen en la publicación PCT WO 97/29131 y la publicación PCT WO 00/56772.

Los anticuerpos monoclonales también se producen inmunizando un animal no humano que comprende algunos o la totalidad de los loci de la inmunoglobulina humana con un antígeno de interés. En una forma de realización, el animal no humano es un ratón transgénico XENOMOUSE, que es una cepa de ratón modificada que comprende fragmentos grandes de loci de inmunoglobulina humana y presenta una producción de anticuerpos diferentes. Véanse, por ejemplo, Green et al., *Nature Genetics*, 1994, 7:13-21 y las Patentes de los EE.UU. N°: 5.916.771, 5.939.598, 5.985.615, 5.998.209, 6.075.181,

6.091.001, 6.114.598 y 6.130.364. Véanse también las Publicaciones PCT N°: WO 91/10741; WO 94/02602; WO 96/34096; WO 96/33735; WO 98/16654; WO 98/24893; WO 98/50433; WO 99/45031; WO 99/53049; WO 00/09560; y WO 00/037504. El ratón transgénico XENOMOUSE produce un repertorio humano tipo adulto de anticuerpos completamente humanos y genera anticuerpos monoclonales humanos específicos del antígeno. El ratón transgénico XENOMOUSE contiene aproximadamente un 80% del repertorio humano gracias a la introducción de fragmentos YAC con la configuración de la línea germinal humana, con un tamaño en el orden de las megabases, que contienen loci de la cadena pesada humana y loci de la cadena liviana humana. Véase Mendez *et al.*, (1997) *Nature Genet.*, 15: 146-156 y Green y Jakobovits (1998) *J. Exp. Med.* 188: 483-495.

También se pueden usar métodos *in vitro* para preparar los anticuerpos parentales, donde se analiza una biblioteca de anticuerpos para identificar un anticuerpo que tiene la especificidad de unión deseada. Los métodos para dicho examen de las bibliotecas de anticuerpos recombinantes son bien conocidos en el arte e incluyen los métodos que se describen, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N°: 5.223.409; en las publicaciones PCT N°: WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; WO 97/29131; y en Fuchs *et al.*, (1991) *Bio/Technology* 9: 1369-1372; Hay *et al.*, (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3: 81-85; Huse *et al.*, (1989) *Science* 246: 1275-1281; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348: 552-554; Griffiths *et al.*, (1993) *EMBO J.* 12: 725-734; Hawkins *et al.*, (1992) *J. Mol. Biol.* 226: 889-896;

Clackson et al., (1991) *Nature* 352: 624-628; Gram et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3576-3580; Garrard et al., (1991) *Bio/Technology* 9: 1373-1377; Hoogenboom et al., (1991) *Nucl. Acid Res.*, 19: 4133-4137; y Barbas et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7978-7982, y la publicación de Patente de los EE.UU. N°: 2003/0186374.

Los anticuerpos parentales de utilidad en la presente invención también se pueden generar usando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en fagos, se presentan dominios de anticuerpos funcionales en la superficie de partículas de fagos que contienen las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En particular, estos fagos pueden emplearse para presentar dominios de unión al antígeno expresados a partir de un repertorio o una biblioteca de combinación de anticuerpos (por ejemplo, humanos o murinos). Los fagos que expresan un dominio de unión al antígeno que se une al antígeno de interés se pueden seleccionar o identificar con un antígeno, por ejemplo, usando un antígeno marcado o un antígeno unido o capturado en una superficie sólida o una esfera. Los fagos usados en estos métodos típicamente son fagos filamentosos, e incluyen los dominios de unión fd y M13, expresados a partir de fagos con Fab, Fv o dominios de anticuerpos Fv estabilizados por enlaces disulfuro fusionados en forma recombinante al gen III o al gen VIII de proteínas del fago. Los ejemplos de métodos de presentación en fagos que se pueden usar para preparar los anticuerpos de la presente invención incluyen los que se describen en Brinkmann et al., *J. Immunol. Methods*, 182: 41-50; Ames et al., (1995) *J. Immunol. Methods*, 184: 177-186; Kettleborough et al.,

(1994) *Eur. J. Immunol.*, 24: 952-958; Persic et al., (1997) *Gene* 187: 9-18; Burton et al., (1994) *Adv. Immunol.*, 57: 191-280; Solicitud PCT N°: PCT/GB91/01134; publicaciones PCT N°: WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las Patentes de los EE.UU. N°: 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.780; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Como se describe en las referencias anteriores, una vez seleccionados los fagos, las regiones codificantes del anticuerpo obtenidas de los fagos pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento de unión al antígeno deseado, y pueden expresarse en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamíferos, células de insectos, células vegetales, levaduras y bacterias, por ejemplo, como se describirá con mayor detalle más adelante. Por ejemplo, también podrán emplearse procedimientos para producir fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ de manera recombinante que sean bien conocidos en el arte, tales como los que se describen en la Publicación PCT N° WO 92/22324; Mullinax et al., *BioTechniques*, 12(6): (1992) *BioTechniques* 12(6): 864-869; y Sawai et al., (1995) *AJRI* 34: 26-34; y Better et al., (1988) *Science*, 240: 1041-1043. Los ejemplos de procedimientos que se pueden usar para producir fragmentos Fv y anticuerpos de cadena simple incluyen los que se describen en las Patente de los EE.UU. N°: 4.946.778 y 5.258.498; Huston et al., (1991) *Methods Enzymol.* 203: 46-88; Shu et al.(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7995-7999; y Skerra et al., (1988) *Science* 240:

1038-1041.

Como alternativa al análisis de bibliotecas de anticuerpos recombinantes mediante la presentación en fagos, se pueden aplicar otras metodologías conocidas en el arte para analizar grandes bibliotecas combinatorias con el fin de identificar anticuerpos parentales. Un tipo de sistema de expresión alternativo es uno donde la biblioteca de anticuerpos recombinantes se expresa como fusiones de ARN y proteínas, como se describe en la Publicación PCT N° WO 98/31700, de Szostak y Roberts; y en Roberts, R.W. y Szostak, J.W., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 12297-12302. En este sistema, se crea una fusión covalente entre un ARNm y el péptido o la proteína que codifica, por medio de la traducción *in vitro* de ARNm sintético que contiene puromicina, un antibiótico aceptor de peptidilo, por su extremo 3'. Por consiguiente, se puede enriquecer en un ARNm específico a partir de una mezcla compleja de ARNm (por ejemplo, una biblioteca combinatoria) sobre la base de las propiedades del péptido o la proteína codificada, por ejemplo, el anticuerpo o la porción del mismo, tales como la unión del anticuerpo o una porción del mismo al antígeno de especificidad doble. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o porciones de éstos, recuperadas del análisis de dichas bibliotecas, pueden expresarse por medios recombinantes como se describió con anterioridad (por ejemplo, en células huésped de mamífero), y más aun, pueden someterse a una maduración de afinidad adicional con procedimientos adicionales de análisis de fusiones de ARNm-péptidos en cuyas secuencias originales se han introducido mutaciones, o con otros métodos de maduración por afinidad *in vitro* de anticuerpos

recombinantes, como se describió con anterioridad.

En otro enfoque, los anticuerpos parentales también se pueden generar usando métodos de presentación en levaduras conocidos en el arte. En los métodos de presentación en levaduras, se usan métodos genéticos para unir dominios de anticuerpos a la pared celular de la levadura, de modo que sean presentados sobre la superficie de la levadura. En particular, estas levaduras pueden utilizarse para presentar dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o una biblioteca de combinación de anticuerpos (por ejemplo, humanos o murinos). Los ejemplos de métodos de expresión en levadura que se pueden usar para elaborar los anticuerpos incluyen los divulgados en la Patente de los EE.UU. N°: 6.699.658.

Los anticuerpos que se describieron previamente en la presente pueden ser sometidos a modificaciones adicionales para generar anticuerpos parentales con injertos de CDR y humanizados. Los anticuerpos parentales con injertos de CDR comprenden secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y liviana de un anticuerpo humano, donde una o más de las regiones CDR de la V_H y/o la V_L son reemplazadas por secuencias CDR de anticuerpos murinos capaces de unirse a un antígeno de interés. Una secuencia de la región del marco de trabajo de cualquier anticuerpo humano puede servir como molde para el injerto de CDR. Sin embargo, el reemplazo directo de cadenas en una de estas regiones de marco comúnmente resulta en una cierta pérdida de afinidad de unión al antígeno. Cuanto más homólogo es un anticuerpo humano al anticuerpo murino original, menor es la probabilidad de que la combinación de las CDR murinas con la región

del marco humana introduzca distorsiones en las CDR que puedan reducir la afinidad. Entonces, es preferible que la región variable del marco humano seleccionada para reemplazar la región variable del marco murino, aparte de las CDR, tenga al menos a 65% de identidad de secuencia con la región variable del marco del anticuerpo murino. Es más preferible que las regiones variables humanas y murinas, aparte de las CDR, tengan al menos 70% de identidad de secuencia. Es aun más preferible que las regiones variables humanas y murinas aparte de las CDR tengan al menos 75% de identidad de secuencia. Es más preferible que las regiones variables humanas y murinas, aparte de las CDR, tengan al menos 80% identidad de secuencia. Los métodos para producir dichos anticuerpos son conocidos en el arte (véase, EP 239.400; publicación PCT WO 91/09967; Patentes de los EE.UU. N°: 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), reformulación de residuos en superficie [*veneering*] o reformulación de superficie [*resurfacing*] (EP 592.106; EP 519.596; Padlan (1991) *Mol. Immunol.*, 28(4/5): 489-498; Studnicka et al., (1994) *Protein Engineering* 7(6): 805-814; Roguska et al., (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 969-973) y entremezclado de cadenas (Patente de los EE.UU. N°: 5.565.352).

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que se unen al antígeno deseado y tienen una o más regiones de determinación de la complementariedad (CDR) de la especie no humana, y regiones de marco de una molécula de inmunoglobulina humana. Las secuencias de Ig humanas conocidas se describen, por ejemplo, en www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez-/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html;

www.sciquest.com/; www.abcam.com/;
www.antibodyresource.com/onlinecomp.html;
www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html;
www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html;
www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/mikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html; www.immunologylink.com/;
pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html;
www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.ac.jp/.about.yasuhito-/Elisa.html;
www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html;
www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html;
aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP-Start.html;
baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/;
www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html;
www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/;
www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/;
abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html;
www.unizh.ch/.about.honegger/AHOseminar/Slide01.html;
www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/;
www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/TAHHP.html;
www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html;
www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.abo-

ut.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html; [www.jerini.de/fr products.htm](http://www.jerini.de/fr/products.htm); www.patents.ibm.com/ibm.html. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983), cada uno de los cuales se incorpora por completo en la presente a modo de referencia. Estas secuencias importadas se pueden usar para reducir la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar la afinidad de unión, la velocidad de activación, la velocidad de desactivación, la avidéz, la especificidad, la vida media o cualquier otra característica apropiada, como es conocido en el arte.

Los residuos de la región del marco de trabajo en las regiones del marco de trabajo humano se pueden reemplazar por los residuos correspondientes de la CDR del anticuerpo donante para alterar, preferiblemente mejorar la unión al antígeno. Estas sustituciones del marco de trabajo se identifican mediante métodos bien conocidos en el arte, por ejemplo, por modelación de las interacciones de los residuos de la CDR y del marco de trabajo para identificar los residuos del marco de trabajo que son importantes para la unión al antígeno y por comparación de secuencias para identificar residuos poco comunes del marco de trabajo en posiciones particulares (Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N°: 5.585.089; Riechmann et al., (1988) Nature 332: 323. Los modelos tridimensionales de la inmunoglobulina comúnmente se encuentran disponibles y son conocidos por los especialistas en el arte. Hay programas informáticos disponibles que permiten ilustrar y presentar estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas representaciones permite analizar la participación de los

residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de unión de la inmunoglobulina candidata a su antígeno. De este modo, se pueden aislar y combinar residuos FR de secuencias consenso e importadas con el fin de obtener una característica deseada en el anticuerpo, tal como la afinidad de unión por uno o más antígenos blanco. En general, los residuos de las CDR tienen una influencia directa y más sustancial sobre la unión al antígeno. Los anticuerpos pueden ser humanizados usando una variedad de técnicas conocidas en el arte tales como, pero en un sentido no taxativo, las que se describen en Jones et al. (1986) *Nature* 321: 522; Verhoeyen et al., (1988) *Science* 239: 1534; Sims et al., (1993) *J. Immunol.*, 151: 2296; Chothia y Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901; Carter et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4285; Presta et al., (1993) *J. Immunol.*, 151: 2623; Padlan (1991) *Mol. Immunol.*, 28(4/5): 489-498; Studnicka et al., (1994) *Prot. Engineer.* 7(6): 805-814; Roguska et al., (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 969-973; publicación PCT N°: WO 91/09967; US98/16280; US96/18978; US91/09630; US91/05939; US94/01234; GB89/01334; GB91/01134; GB92/01755; WO90/14443; WO90/14424; y WO90/14430; publicaciones de Patentes Europeas N°: EP 99; EP 97; EP 20032; y EP 92; y las Patentes de los EE.UU. N°: 5.565.332; 5.723.323; 5.976.862; 5.824.514; 5.817.483; 5.814.476; 5.763.192; 5.723.323; 5.766.886; 5.714.352; 6.204.023; 6.180.370; 5.693.762; 5.530.101; 5.585.089; 5.225.539; y 4.816.567.

Los anticuerpos monoclonales parentales se pueden seleccionar entre diversos anticuerpos monoclonales capaces de unirse a la IL-1 α o a la IL-1 β .

Los anticuerpos monoclonales parentales también se pueden seleccionar entre diferentes anticuerpos terapéuticos aprobados para su uso, en ensayos clínicos o en el desarrollo para su uso clínico.

B. Construcción de moléculas de DVD-Ig

Una molécula de inmunoglobulina con dominio variable dual (DVD-Ig) se diseña de tal modo que se asocian en tándem dos dominios variables de cadena liviana (VL) diferentes provenientes de los dos anticuerpos monoclonales parentales diferentes en forma directa o a través de un conector corto mediante técnicas de ADN recombinante, seguidos por el dominio constante de la cadena liviana. De manera similar, la cadena pesada comprende dos dominios variables de la cadena pesada (VH) diferentes asociados en tándem, seguidos por el dominio constante CH1 y la región Fc. Véase, la publicación PCT N°: WO 2007/024715.

Los dominios variables pueden obtenerse usando técnicas de ADN recombinante a partir de un anticuerpo progenitor que se genera por alguno de los métodos que se describieron previamente. En una forma de realización preferida, el dominio variable es un dominio variable de la cadena pesada o liviana de murino. Más preferiblemente, el dominio variable es un dominio variable de la cadena pesada o liviana con CDR injertada o humanizado. Con mayor preferencia, el dominio variable es un dominio variable humano de la cadena pesada o liviana.

En una forma de realización el primero y segundo dominios variables se asocian directamente entre ellos usando técnicas de ADN recombinante. En otra

forma de realización, los dominios variables se asocian a través de una secuencia conectora. Preferiblemente, se ligan o conectan dos dominios variables. También se pueden asociar tres o más dominios variables en forma directa o a través de una secuencia conectora. Los dominios variables se pueden unir al mismo antígeno o se pueden unir a antígenos diferentes. Las moléculas de DVD-Ig de la invención pueden incluir un dominio variable de inmunoglobulina y un dominio variable de no inmunoglobulina tal como un dominio de unión a ligando de un receptor, el dominio activo de una enzima. Las moléculas DVD también pueden comprender 2 o más dominios no Ig.

La secuencia conectora puede ser un solo aminoácido o una secuencia polipeptídica. Los ejemplos de secuencias conectoras que se pueden usar para diseñar y producir proteínas de unión DVD-Ig de utilidad en los métodos y las composiciones que se describen en la presente incluyen, pero en un sentido no taxativo, AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID N°:59); AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID N°:60); AKTTPKLGG (SEQ ID N°:61); SAKTTPKLGG (SEQ ID N°:62); SAKTTP (SEQ ID N°:63); RADAAP (SEQ ID N°:64); RADAAPTVS (SEQ ID N°:65); RADAAAAGGPGS (SEQ ID N°:66); RADAAAA(G₄S)₄ (SEQ ID N°:67); SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID N°:68); ADAAP (SEQ ID N°:69); ADAAPTVSIFPP (SEQ ID N°:70); TVAAP (SEQ ID N°:71); TVAAPSVFIFPP (SEQ ID N°:72); QPKAAP (SEQ ID N°:73); QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID N°:74); AKTTPP (SEQ ID N°:75); AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID N°:76); AKTTAP (SEQ ID N°:77); AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID N°:78); ASTKGP (SEQ ID N°:79); ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID N°:80); GGSGGGGGSG (SEQ ID N°:81); GGGSGGGGGSGGGGS (SEQ

ID N°:82); GENKVEYAPALMALS (SEQ ID N°:83); GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID N°:84); GHEAAVMQVQYPAS (SEQ ID N°:85); TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (SEQ ID N°:86); y ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (SEQ ID N°:87). La elección de las secuencias conectoras se basa en el análisis de la estructura cristalina de varias moléculas Fab. Existe un acoplamiento flexible natural entre el dominio variable y el dominio constante CH1/CL en Fab o en la estructura molecular del anticuerpo. Este acoplamiento natural comprende aproximadamente entre 10 y 12 residuos de aminoácidos, contribuidos por entre 4 y 6 residuos del extremo C terminal del dominio V y entre 4 y 6 residuos del extremo N terminal del dominio CL/CH1. En una forma de realización, una molécula de DVD-Ig de utilidad en la invención se genera usando 5-6 residuos de aminoácidos N-terminales u 11-12 residuos de aminoácidos de CL o CH1 como conector en las cadenas liviana y pesada de una molécula de DVD-Ig, respectivamente. Los residuos N terminales de los dominios CL o CH1, en particular los primeros 5 a 6 residuos de aminoácidos, adoptan una conformación en bucle sin estructuras secundarias fuertes, y por lo tanto pueden actuar como conectores flexibles entre los dos dominios variables. Los residuos N terminales de los dominios CL ó CH1 son extensiones naturales de los dominios variables, ya que son parte de las secuencias de inmunoglobulina, y por lo tanto minimizan en gran medida cualquier inmunogenicidad potencial que pueda surgir de los conectores y los empalmes.

Otras secuencias conectoras pueden incluir cualquier secuencia de cualquier longitud del dominio CL/CH1 pero no todos los residuos del dominio

CL/CH1 (por ejemplo, los primeros 5-12 residuos de aminoácidos de los dominios CL/CH1); los conectores de la cadena liviana pueden ser de C κ o C λ ; y los conectores de la cadena pesada pueden derivar del CH1 de cualquier isotipo, incluyendo C γ 1, C γ 2, C γ 3, C γ 4, C α 1, C α 2C δ , C ϵ y C μ . Las secuencias conectoras también pueden derivar de otras proteínas, tales como proteínas similares a Ig (por ejemplo, TCR, FcR, KIR), pueden ser secuencias basadas en G/S, (por ejemplo, repeticiones G4S; (SEQ ID N°: 88)); secuencias derivadas de la región de la bisagra o secuencias de otras proteínas naturales.

En una forma de realización se asocia un dominio constante a los dos dominios variables asociados usando técnicas de ADN recombinante. Preferiblemente, la secuencia que comprende dominios variables de la cadena pesada asociados de la cadena pesada se asocia a un dominio constante de la cadena pesada y la secuencia que comprende dominios variables de cadena liviana asociados se asocia a un dominio constante de la cadena liviana. Preferiblemente, los dominios constantes comprenden un dominio constante de la cadena pesada humano y un dominio constante de la cadena liviana humano, respectivamente, cuando la proteína de unión DVD-Ig se utilizará en un ser humano. Preferiblemente, la cadena pesada de DVD-Ig está unida además a una región Fc. La región Fc puede ser la secuencia de una región Fc nativa o de una variante de una región Fc. Con mayor preferencia, la región Fc es una región Fc humana. En una forma de realización preferida, la región Fc incluye una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE o IgD.

En otra forma de realización, se combinan dos polipéptidos de DVD-Ig de la

cadena pesada y dos polipéptidos de DVD-Ig de la cadena liviana para formar una molécula de DVD-Ig. Se han descrito previamente descripciones detalladas de ejemplos de las moléculas de DVD-Ig específicas capaces de unirse a blancos específicos y de métodos para elaborar las mismas. Véase, por ejemplo, la publicación PCT N°: WO 2007/024715.

C. Producción de proteínas de unión DVD-Ig

Las proteínas DVD-Ig que se unen a la IL-1 α y a la IL-1 β y que son de utilidad en los métodos y las composiciones que se describen en la presente para tratar la osteoartritis se pueden producir mediante cualquiera de numerosas técnicas conocidas en el arte. Véase, por ejemplo, la publicación PCT N°: 2007/024715. Por ejemplo, la expresión a partir de células huésped, en donde los vectores de expresión que codifican las cadenas pesadas de DVD-Ig y livianas de DVD-Ig se transfectan en una célula huésped mediante técnicas estándar. Las diversas formas del término “transfección” abarcan una amplia variedad de procedimientos de uso común para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano, y semejantes. Aunque es posible expresar las proteínas de unión DVD-Ig de la invención en células huésped procariotas o eucariotas, es preferible la expresión de las proteínas de unión DVD-Ig en células eucariotas, y es más preferible en células huésped de mamíferos, ya que la probabilidad de que se ensamble y se secrete una proteína DVD-Ig plegada correctamente y con actividad inmunológica es mayor en dichas células eucariotas (y en particular, en células de mamífero) que en las células

eucariotas.

Las células huésped de mamíferos preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células CHO (incluyendo las células CHO dhfr⁻ descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216-4220, que se usan en combinación con un marcador de selección DHFR, como se describe, por ejemplo, en R.J. Kaufman y P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159: 601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinantes que contienen genes que codifican el proteínas DVD-Ig se introducen en células huésped de mamíferos, las proteínas DVD-Ig se producen cultivando las células huésped hasta que las proteínas DVD-Ig se expresan en dichas células huésped o, más preferiblemente, hasta que las proteínas DVD-Ig se secretan en el medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Las proteínas DVD-Ig se pueden aislar del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas convencionales.

En un sistema preferido para la expresión recombinante de las proteínas DVD-Ig de utilidad de la invención, se introduce un vector de expresión recombinante que codifica la cadena pesada de las proteínas DVD-Ig y la cadena liviana de las proteínas DVD-Ig en células CHO dhfr⁻ a través de una transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de las cadenas pesada y liviana de DVD-Ig están unidos operativamente en cada caso a elementos reguladores, que consisten en el potenciador de CMV y el promotor AdMLP, con el fin de obtener niveles de transcripción elevados de los genes. El vector de expresión recombinante también contiene un gen DHFR, que

permite seleccionar las células CHO dhfr⁻ transfectadas con el vector usando una selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformadas seleccionadas se cultivan de modo que se expresen las cadenas pesada y liviana de DVD-Ig, y la proteína DVD-Ig intacta se aísla del medio de cultivo. Se usan técnicas convencionales de biología molecular para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar las transformantes, cultivar dichas células huésped y obtener la proteína DVD-Ig del medio de cultivo. Adicionalmente, en la invención se provee un método para sintetizar una proteína DVD-Ig de la invención, que comprende cultivar una célula huésped de la invención en un medio de cultivo apropiado hasta que se ha sintetizado una proteína DVD-Ig de la invención. Además, el método puede comprender aislar dicha proteína DVD-Ig del medio de cultivo.

Una característica importante de la proteína de unión DVD-Ig es que puede ser producida y purificada de una manera similar que un anticuerpo convencional. La producción de la proteína de unión DVD-Ig resulta en un solo producto de importancia homogéneo con la actividad con especificidad dual deseada, sin modificaciones de secuencia en la región constante o modificaciones químicas de ningún tipo. Otros métodos descritos con anterioridad para generar proteínas de unión completas “biespecíficas”, “multiespecíficas” y “multiespecíficas multivalentes” no resultan en un solo producto primario, sino que resultan en la producción intracelular o por secreción de una mezcla de proteínas de unión monoespecíficas, multiespecíficas o multivalentes completas, y proteínas de unión multivalentes completas con combinaciones de distintos sitios de unión. A modo

de ejemplo, sobre la base del diseño descrito por Miller y Presta (Publicación PCT WO2001/077342(A1), hay 16 combinaciones posibles de cadenas pesadas y livianas. En consecuencia es probable que solamente un 6,25% de la proteína se encuentre en la forma activa deseada. Aún no se ha demostrado la separación de las formas completamente activas de la proteína de las formas inactivas y parcialmente activas usando las técnicas de cromatografía convencionales que típicamente se emplean en la fabricación a gran escala.

Sorprendentemente, el diseño de las proteínas de unión DVD-Ig, que son "proteínas de unión de longitud completa multivalentes con especificidad dual", conduce a un dominio variable dual de la cadena liviana y a un dominio variable dual de la cadena pesada que primariamente se ensambla para obtener las "proteínas de unión de longitud completa multivalentes con especificidad dual" deseadas, es decir, una proteína de unión DVD-Ig funcional. Véase, la publicación PCT N°: WO 2007/024715.

II. Proteínas de unión cristalinas y derivatizadas

La invención incluye métodos y composiciones para tratar osteoartritis que comprenden una proteína de unión que es un cristal. En una forma de realización, las proteínas de unión cristalizadas tienen una vida media *in vivo* más larga que la contraparte soluble de la proteína de unión. En otra realización, la proteína de unión conserva su actividad biológica después de la cristalización.

Las proteínas de unión cristalizadas de la invención se pueden producir de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, y tal como se describe en la Publicación PCT N° WO 02072636, que se incorpora en la presente a modo de

referencia.

En una forma de realización de la invención, se emplea una proteína de unión glicosilada, en donde la proteína de unión o una porción de unión al antígeno de la misma comprende uno o más residuos de hidrato de carbono. La producción de proteínas nativas *in vivo* puede incluir un procesamiento adicional, conocido como modificación de post-traducción. En particular, se pueden agregar residuos de azúcares (glucosilo) en forma enzimática, un proceso conocido como glucosilación. Las proteínas resultantes, que contienen cadenas laterales de oligosacáridos unidas en forma covalente, son conocidas como proteínas glicosiladas o glucoproteínas. Los anticuerpos son glucoproteínas con uno o más residuos de hidrato de carbono en el dominio Fc, así como en el dominio variable. Los residuos de hidrato de carbono en el dominio Fc tienen un efecto importante en la función efectora del dominio Fc, con un efecto menor en la unión al antígeno o la vida media del anticuerpo (R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* 21: 11-16). Por el contrario, la glucosilación del dominio variable puede tener efecto sobre la actividad de unión al antígeno del anticuerpo. La glicosilación en el dominio variable puede tener un efecto negativo sobre la afinidad de unión del anticuerpo, probablemente debido a impedimento estérico (Co, M.S., *et al.*, (1993) *Mol. Immunol.*, 30: 1361-1367), o puede dar como resultado una afinidad aumentada por el antígeno (Wallick *et al.*, (1988) *Exp. Med.*, 168: 1099-1109; Wright, A., *et al.*, (1991) *EMBO J.* 10: 2717-2723).

También es posible generar mutantes del sitio de glucosilación en los cuales se ha mutado un sitio de glucosilación O- o N-ligado de una proteína de

unión. El especialista en el arte puede generar dichos mutantes mediante el uso de tecnologías convencionales. Los mutantes del sitio de glucosilación que retienen la actividad biológica pero cuya actividad de unión ha aumentado o disminuido también se pueden usar en los métodos y las composiciones que se describen en la presente para tratar la osteoartritis.

Se puede modificar la glucosilación de una proteína de unión, o de una porción de unión al antígeno de la misma, que es de utilidad en los métodos y las composiciones de la invención. Por ejemplo, es posible generar un anticuerpo no glicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glucosilación se puede alterar, por ejemplo, para incrementar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dichas modificaciones del hidrato de carbono pueden obtenerse, por ejemplo, mediante la alteración de uno o más sitios de glucosilación en la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glucosilación en la región variable, para eliminar de este modo la glucosilación en ese sitio. Dicha aglucosilación puede incrementar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Este enfoque se describe con mayor detalle en la Publicación PCT N° WO 2003/016466 y en las Patentes de los EEUU N° 5.714.350 y 6.350.861.

Adicionalmente o como alternativa, se puede preparar una proteína de unión modificada de utilidad para la invención que tenga un tipo de glicosilación alterada, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de residuos fucosilo o un anticuerpo que tenga incrementadas las estructuras de

GlcNAc bifurcadas. Se ha demostrado que dichos patrones de glucosilación alterados incrementan la capacidad de los anticuerpos de producir ADCC. Dichas modificaciones de los hidratos de carbono se pueden efectuar, por ejemplo, expresando la proteína de unión en una célula huésped con la maquinaria de glucosilación alterada. En la técnica se han descrito células con la maquinaria de glicosilación alterada, que pueden ser usadas como células huésped para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención, y de este modo, producir un anticuerpo con glicosilación alterada. Véanse, por ejemplo, Shields, R. L. *et al.*, (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 26733-26740; Umana et al., (1999) *Nat. Biotech.* 17: 176-181, así como la Patente de Europa N°: EP 1.176.195; y las publicaciones PCT N°: WO 03/035835 y WO 99/5434280.

La glucosilación de las proteínas depende de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, así como de la célula huésped en la cual se expresa la proteína. Distintos organismos pueden producir enzimas de glucosilación diferentes (por ejemplo, glucosiltransferasas y glucosidasas), y pueden tener diferentes sustratos (azúcares nucleotídicos) disponibles. Debido a dichos factores, el patrón de glucosilación, y la composición de residuos glicosídicos, pueden diferir dependiendo del sistema huésped en el cual se expresa la proteína en particular. Los residuos glicosídicos de una proteína de unión útiles en la invención pueden incluir, pero en un sentido no taxativo, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, n-acetilglucosamina y ácido sálico. Preferiblemente, la proteína de unión glicosilada comprende residuos glicosídicos que permiten obtener un patrón de glicosilación humano.

Los especialistas en el arte saben que el cambio en las glucosilaciones de proteínas puede dar como resultado diferentes características en la proteína. Por ejemplo, la eficacia de una proteína terapéutica producida por un microorganismo huésped, tal como una levadura, y glucosilada usando la vía endógena de la levadura, puede ser reducida en comparación con la de la misma proteína expresada en una célula de mamífero, tal como una línea celular CHO. Dichas glucoproteínas también pueden ser inmunogénicas en seres humanos y presentar una vida media reducida *in vivo* después de la administración. Hay receptores específicos en humanos y otros animales que pueden reconocer residuos glicosídicos específicos y promover la rápida eliminación de la proteína del torrente sanguíneo. Otros efectos adversos pueden incluir cambios en el plegamiento de las proteínas, su solubilidad, su susceptibilidad a proteasas, su circulación, su transporte, su compartimentalización, su secreción, el reconocimiento por otras proteínas o factores, su antigenicidad, o su alergenicidad. En consecuencia, un profesional puede preferir una proteína terapéutica con una composición y un patrón de glicosilación específicos, por ejemplo, una composición de glicosilación y un patrón idénticos, o al menos similares, a los producidos en las células humanas o las células con especificidad de especie del animal sujeto previsto.

La expresión de proteínas glucosiladas diferentes de las de una célula huésped se puede llevar a cabo mediante la modificación genética de la célula huésped para expresar enzimas de glucosilación heterólogas. Un profesional puede generar anticuerpos o porciones de unión al antígeno de los mismos que

presenten la glucosilación de las proteínas humanas usando procedimientos conocidos en el arte. Por ejemplo, se han modificado cepas de levadura para expresar enzimas de glucosilación de origen no natural, tales como las proteínas glucosiladas (glicoproteínas) producidas en estas cepas de levaduras que presentan una glucosilación proteica idéntica a aquella de las células animales, especialmente las células humanas (publicaciones de Patentes de los EE.UU. N°: 2004/0018590 y 2002/0137134 y publicación PCT N°: WO 2005/100584).

Además, el especialista en el arte ha de apreciar que es posible expresar una proteína de interés usando una biblioteca de células huésped diseñadas genéticamente para expresar distintas enzimas de glucosilación, de modo que los miembros de dicha biblioteca de células huésped produzcan la proteína de interés con patrones de glucosilación variantes. Por lo tanto, un profesional puede seleccionar y aislar una proteína de interés con nuevos patrones de glucosilación particulares. Preferiblemente, la proteína que tiene un nuevo patrón de glucosilación particularmente seleccionado presenta propiedades biológicas mejoradas o alteradas.

IV. Composiciones farmacéuticas

En los métodos de la invención se emplean composiciones farmacéuticas para tratar osteoartritis o dolor en un individuo que comprenden una o más proteínas de unión que se unen a la IL-1 α y/o a la IL-1 β . Dichas composiciones también pueden comprender un vehículo, un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable, o cualquier otro compuesto que proporcione un beneficio terapéutico, farmacéutico o farmacológico deseable a la composición

distinto de la actividad de dichas una o más proteínas de unión de unirse a la IL-1 α y/o a la IL-1 β . En una forma de realización, una composición útil en el tratamiento de osteoartritis o dolor en un individuo de acuerdo con la invención comprende una proteína de unión que se une a la IL-1 α , por ejemplo un anticuerpo anti-IL-1 α , y una proteína de unión que se une a la IL-1 β , tal como un anticuerpo anti-IL-1 β , o una proteína de unión que se une a ambas IL-1 α y/o IL-1 β , tal como una proteína de unión DVD-Ig IL-1 α/β .

Las proteínas de unión que son de utilidad en los métodos de la invención se pueden incorporar en las composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a un sujeto. Típicamente, una composición farmacéutica comprende una o más proteínas de unión que se unen a la IL-1 α y/o a la IL-1 β y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Según se usa en la presente, un “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye en un sentido amplio cualquiera de los solventes, los medios de dispersión, los recubrimientos, los agentes antibacterianos y antifúngicos, los agentes isotónicos y los agentes que demoran de absorción, y semejantes, que sean compatibles con el uso fisiológico. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de los siguientes: agua, solución salina, solución amortiguadora salina con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y semejantes, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir un agente isotónico, por ejemplo, azúcar, polialcohol (por ejemplo, manitol o sorbitol) o cloruro de sodio, en la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o

emulsionantes, conservantes o soluciones amortiguadoras, que mejoran la vida útil o eficacia del anticuerpo o una porción de anticuerpo.

Se conocen diversos sistemas de administración y se pueden usar para administrar una o más proteínas de unión de utilidad en la invención o una combinación de una o más proteínas de unión y un agente profiláctico u otro agente terapéutico de utilidad para prevenir, manejar, tratar o aliviar la osteoartritis o el dolor en un individuo, por ejemplo, encapsulamiento en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar la proteína de unión o un fragmento de la misma, y endocitosis mediada por un receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu (1987), *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc. Los métodos para administrar a un individuo una proteína de unión que se une a la IL-1 α y/o IL-1 β incluyen, pero en un sentido no taxativo, la administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea), la administración epidural, la administración intratumoral y la administración a través de las mucosas (por ejemplo, las vías intranasal u oral). Además, se puede emplear una administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o un nebulizador, y la formulación con un agente para una aplicación en aerosol. Véase por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N°: 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 y 4880078 y las Publicaciones PCT N° WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903. En una forma de realización, una proteína de unión de utilidad en la invención se administra usando la tecnología de administración

pulmonar de drogas Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.). En una forma de realización específica, una proteína de unión de utilidad en la invención se administra por vía intramuscular, intravenosa, intratumoral, oral, intranasal, pulmonar o subcutánea. La proteína de unión se puede administrar por cualquier ruta apropiada, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través del revestimiento epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, mucosa oral, rectal y mucosa intestinal, etc), y se pueden administrar en combinación con otros agentes con actividad biológica. La administración puede ser sistémica o local.

En una forma de realización específica, puede ser deseable administrar una proteína de unión localmente en el área que necesita del tratamiento, tal como directamente en el área de una articulación. Esto se puede lograr, por ejemplo, y en un sentido no taxativo, mediante infusión local, inyección o por medio de un implante, en donde dicho implante es un material poroso o no poroso, incluyendo membranas y matrices, tales como membranas sialásticas, polímeros, matrices fibrosas (por ejemplo, Tissuel®) o matrices de colágeno. En una forma de realización, una cantidad eficaz de una o más proteínas de unión se administra localmente en la articulación afectada para tratar, manejar, aliviar y/o prevenir el progreso adicional de la degeneración del cartílago, que de lo contrario pasaría en la osteoartritis, incluyendo dolor. En otra forma de realización, se administra una cantidad eficaz de una o más proteínas de unión localmente en la articulación afectada en combinación con una cantidad eficaz de una o más terapias adicionales (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) distintas de las proteínas de unión para prevenir, tratar, manejar y/o aliviar la

osteoartritis o uno o más síntomas de la misma, incluyendo dolor.

En otra forma de realización, proteínas de unión a IL-1 α e IL-1 β se pueden administrar en un sistema de liberación controlada o de liberación sostenida. En una forma de realización, se puede usar una bomba para lograr una liberación controlada o sostenida (véase Langer (1990) *Science* 249: 1527-1533; Sefton (1987) *CRC Crit. Rev. Biomed. Eng.*, 14: 201-240; Buchwald et al., (1980) *Surgery* 88: 507-516; Saudek et al., (1989) *N. Engl. J. Med.*, 321: 574-579). En otra forma de realización, se pueden usar materiales poliméricos para obtener una liberación controlada o sostenida de las proteínas de unión de utilidad en la invención (véase, por ejemplo, *Medical Applications of Controlled Release*, (Langer y Wise, eds.) (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1984); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance* (Smolen y Ball, eds.), (Wiley, Nueva York, 1984); Langer y Peppas (1983) *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. Phys.* C23: 61-126; véase también Levy et al., (1985) *Science* 228: 190-192; During et al., (1989) *Ann. Neurol.* 25: 351-356; Howard et al., (1989) *J. Neurosurg.* 71: 105-112); Patentes de los EE.UU. N°: 5.679.377; 5.916.597; 5.912.015; 5.989.463; y 5.128.326; y las publicaciones PCT N°: WO 99/15154 y WO 99/20253. Los ejemplos de polímeros que se pueden usar en las formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero en un sentido no limitativo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), poli(metilmetacrilato), poli(ácido acrílico), poli(etilen-co-vinilacetato), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), poliacrilamida, poli(etilenglicol), poliláctidos (PLA), poli(láctido-co-glicólidos) (PLGA) y poliortoésteres. En una forma de realización, el

polímero usado en la formulación de liberación sostenida es inerte, está libre de impurezas lixiviables, es estable al almacenamiento, estéril y biodegradable. En aún otra forma de realización, se puede colocar un sistema de liberación controlada o sostenida en la proximidad de un blanco profiláctico o terapéutico, de modo que se requiera solamente una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, J.M., Capítulo 6, En *Medical Applications of Controlled Release*, Vol. II, *Applications and Evaluation*, (Langer y Wise, eds.)(CRC Press, Inc., Boca Raton, 1984), páginas 115-138).

Los sistemas de liberación controlada se describen en la revisión de Langer (1990, *Science* 249:1527-1533). Se puede usar cualquier técnica conocida por los especialistas en la técnica para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención. Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N°: 4.526.938; y las publicaciones PCT N°: WO 91/05548 y WO 96/20698; y Ning et al., (1996) *Radiother. Oncol.* 39: 179-189; Song et al., (1996) *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 50: 372-377; Cleek et al., (1997) *Proceed Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24: 853-854; y Lam et al., (1997) *Proceed. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24: 759-760.

En una forma de realización específica, donde una composición de utilidad en la invención es un ácido nucleico que codifica una proteína que se une a la IL-1 α y/o a la IL-1 β , dicho ácido nucleico se puede administrar *in vivo* para promover la expresión de su agente profiláctico o terapéutico codificado, por construcción del mismo como parte de un apropiado vector de expresión de ácido nucleico y administración del mismo de modo que se vuelva intracelular, por ejemplo,

mediante el uso de un vector retroviral (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N°: 4.980.286), o por inyección directa o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, con una pistola génica; Biolistic, Dupont) o de un recubrimiento con lípidos o receptores de la superficie celular o con agentes de transfección, o por administración en combinación con un péptido semejante a homeobox del que se sabe que ingresa al núcleo (véase, por ejemplo, Joliot et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1864-1868). Como alternativa, el ácido nucleico se puede introducir intracelularmente y se puede incorporar en el ADN de la célula huésped para su expresión mediante recombinación de homólogos.

La composición farmacéutica de utilidad en la invención para tratar osteoartritis o dolor se formula para que sea compatible con su ruta de administración pretendida. Los ejemplos de rutas de administración incluyen, pero en un sentido no limitativo, la administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, intranasal (por ejemplo, por inhalación), transdérmica (por ejemplo, tópica), transmucosa y rectal. En una forma de realización específica, la composición se formula de acuerdo con los procedimientos de rutina, como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, intranasal o tópica e sujetos humanos. Típicamente, las composiciones para una administración intravenosa son soluciones en solución amortiguadora acuosa isotónica estéril. Cuando fuera necesario, la composición también puede incluir un agente de solubilización y un anestésico local, tal como lignocamina, para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Si las composiciones de utilidad en la invención para tratar

osteoartritis o dolor son para una administración tópica, las formulaciones se pueden formular en la forma de un ungüento, una crema, un parche transdérmico, una loción, un gel, un champú, un atomizado, un aerosol, una solución, una emulsión u otra forma bien conocida por los especialistas en el arte. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, 19ª edición, (Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1995). Para las formas de dosificación tópica no atomizables, generalmente se emplean formas entre viscosas y semisólidas o sólidas, que comprenden un vehículo o uno o más excipientes compatibles con la aplicación tópica, y que tienen una viscosidad dinámica preferiblemente mayor que el agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, pero en un sentido no taxativo, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, ungüentos, polvos, linimentos, pomadas y semejantes. En una forma de realización, dichas formulaciones fueron esterilizadas o se mezclaron con agentes auxiliares (por ejemplo, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, soluciones amortiguadoras o sales) para afectar diversas propiedades, tal como, por ejemplo, la presión osmótica. Otras formas de dosificación tópica adecuadas incluyen preparaciones en aerosol rociables, en donde el ingrediente activo, por ejemplo, en combinación con un vehículo sólido o líquido inerte, es envasado en una mezcla con un compuesto volátil presurizado (por ejemplo, un propelente gaseoso, tal como FREON®) o en una botella lavadora o de compresión. Si se lo desea, también se pueden agregar hidratantes o humectantes a las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación. Los ejemplos de dichos ingredientes adicionales son bien conocidos

en la técnica.

Si el método de la invención para tratar osteoartritis o dolor comprende una administración intranasal de una composición, donde la composición puede formularse en forma de un aerosol, rocío, niebla o en forma de gotas. En particular, la proteína de unión para su uso de acuerdo con la presente invención puede administrarse convenientemente bajo la forma de una presentación como rocío en aerosol, a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente apropiado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas apropiado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar con una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y los cartuchos (compuestos, por ejemplo, por gelatina) se pueden formular para usar en un inhalador o un insuflador que contenga una mezcla del polvo del compuesto con una base de polvo apropiada, tal como lactosa o almidón.

Si el método de la invención para tratar osteoartritis o dolor comprende la administración oral, la composición se puede formularse por vía oral en la forma de tabletas, cápsulas, sellos, cápsulas de gelatina, soluciones, suspensiones y semejantes. Las tabletas o las cápsulas se pueden preparar por medios convencionales, con agentes excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); rellenos (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o fosfato ácido de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); desintegrantes (por ejemplo, almidón de

papa o glicolato sodio de almidón); o agentes de humectación (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Las tabletas se pueden recubrir mediante métodos conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tomar la forma, en un sentido no taxativo, de soluciones, jarabes o suspensiones, en un sentido no limitativo, o pueden presentarse como un producto seco para la reconstitución con agua u otro vehículo apropiado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas se pueden preparar utilizando medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas hidrogenadas comestibles); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales amortiguadoras, agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes, según sea apropiado. Las preparaciones para una administración por vía oral se pueden formular convenientemente para una liberación lenta, una liberación controlada o una liberación sostenida de la o las proteínas de unión de utilidad en la invención para tratar osteoartritis o dolor.

Un método para tratar la osteoartritis o un método de tratamiento del dolor de acuerdo con la invención puede comprender una administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, de una composición formulada con un agente para la aplicación en aerosol. Véase por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N°: 6.019, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064,

5855913, 5290540 y 4880078 y las publicaciones PCT N° WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903. En una forma de realización específica, una proteína de unión que se une a la IL-1 α y/o a la IL-1 β o una terapia combinada para tratar osteoartritis, se administra usando la tecnología de administración pulmonar de drogas Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts).

Un método de la invención puede comprender la administración de una composición que comprende una proteína de unión que se une a la IL-1 α y/o a la IL-1 β que se formula para una administración parenteral mediante inyección (por ejemplo, por inyección de bolo o infusión continua). Las formulaciones para inyección se pueden presentar en una forma de dosificación unitaria (por ejemplo, en ampollas o recipientes con dosificaciones múltiples) con adición de un conservante. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos al aceite o acuosos, y pueden contener agentes de la formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, la proteína de unión puede tomar la forma de un polvo para reconstituir con un vehículo apropiado (por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos) antes de usarlo.

Los métodos de la invención pueden comprender la administración de composiciones formuladas como preparaciones depot. Dichas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo, en forma subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. De este modo, por ejemplo, las composiciones se pueden formular con materiales poliméricos o

hidrofóbicos apropiados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles (por ejemplo, como una sal moderadamente soluble).

Los métodos de la invención abarcan la administración de composiciones formuladas como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con aniones, tales como aquellos derivados de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etcétera, y aquellos formados con cationes, tales como aquellos derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etcétera.

Por lo general, los ingredientes de las composiciones se proveen en forma separada o mezclados en una unidad de forma de dosificación, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente, tal como una ampolla o un saché donde se indica la cantidad de agente activo. En los casos en que el modo de administración sea la infusión, la composición podrá administrarse con una botella de infusión que contenga agua o solución salina estéril de grado farmacéutico. Cuando el modo de administración es por inyección, se puede proveer una ampolla de agua para inyección o salina estéril para que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

La invención también provee una o más proteínas de unión que se unen a IL-1 α y/o IL-1 β o una composición farmacéutica que comprende a dichas proteínas de unión envasadas en un recipiente sellado herméticamente, tal como una ampolla o un sachét, en el cual se indica la cantidad del agente. En una

forma de realización, se suministra una o más proteínas de unión que se unen a la IL-1 α y/o a la IL-1 β , o una composición farmacéutica que comprende dichas proteínas de unión, como un polvo liofilizado esterilizado seco o como un concentrado sin agua en un recipiente sellado herméticamente y que puede ser reconstituido (por ejemplo, con agua o con salina) hasta la concentración apropiada para su administración a un sujeto para tratar artritis o dolor. En una forma de realización, se provee una o más proteínas de unión que se unen a la IL-1 α y/o a la IL-1 β , o una composición farmacéutica que comprende a dichas proteínas de unión, como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente sellado herméticamente con una unidad dosificación de por lo menos aproximadamente 5 mg, por lo menos aproximadamente 10 mg, por lo menos aproximadamente 15 mg, por lo menos aproximadamente 25 mg, por lo menos aproximadamente 35 mg, por lo menos aproximadamente 45 mg, por lo menos aproximadamente 50 mg, por lo menos aproximadamente 75 mg o por lo menos aproximadamente 100 mg. Las proteínas de unión liofilizadas, o la composición farmacéutica que comprende a dichas proteínas de unión, se debería guardar a una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C en su recipiente original y las proteínas de unión o la composición farmacéutica que comprende a dichas proteínas de unión deberían administrarse en el transcurso de 1 semana, en el transcurso de 5 días, en el transcurso de 72 horas, en el transcurso de 48 horas, en el transcurso de 24 horas, en el transcurso de 12 horas, en el transcurso de 6 horas, en el transcurso de 5 horas, en el transcurso de 3 horas o en el transcurso de 1 hora después de su reconstitución. En una forma de realización alternativa,

se provee una o más proteínas de unión que se unen a la IL-1 α y/o a la IL-1 β , o una composición farmacéutica que comprende a dichas proteínas de unión, en una forma líquida en un recipiente sellado herméticamente en el cual se indique la cantidad y la concentración del agente. En una forma de realización, la forma líquida de la composición administrada se suministra en un recipiente herméticamente sellado a por lo menos 0,25 mg/ml aproximadamente, al menos 0,5 mg/ml aproximadamente, al menos 1 mg/ml aproximadamente, al menos 2,5 mg/ml aproximadamente, al menos 5 mg/ml aproximadamente, al menos 8 mg/ml aproximadamente, al menos 10 mg/ml aproximadamente, al menos 15 mg/kg aproximadamente, al menos 25 mg/ml aproximadamente, al menos 50 mg/ml aproximadamente, al menos 75 mg/ml aproximadamente o al menos 100 mg/ml aproximadamente. La forma líquida se debería guardar a una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C en su recipiente original.

Las proteínas de unión de utilidad en los métodos y las composiciones que se describen en la presente se pueden incorporar en una composición farmacéutica adecuada para una administración parenteral. En un aspecto, las proteínas de unión se prepararán como una solución inyectable que contiene entre aproximadamente 0,1 mg/ml y aproximadamente 250 mg/ml de anticuerpo. La solución inyectable puede estar compuesta por una forma de dosificación líquida o liofilizada en un recipiente, una ampolla o una jeringa de color sílex o ámbar rellena con antelación. La solución amortiguadora puede ser L-histidina (entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 50 mM), preferiblemente entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 10 mM, a un pH de entre

aproximadamente 5,0 y aproximadamente 7,0 (con preferencia un pH de aproximadamente 6,0). Otras soluciones amortiguadoras adecuadas incluyen, pero en un sentido no taxativo, succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio. Se puede usar cloruro de sodio para modificar la toxicidad de la solución a una concentración de entre aproximadamente 0 y aproximadamente 300 mM (con preferencia, a 150 mM aproximadamente para una forma de dosificación líquida). Se pueden incluir crioprotectores para una forma de dosificación liofilizada, principalmente entre aproximadamente 0 y aproximadamente 10% de sacarosa (con preferencia, entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 1,0%). Otros crioprotectores adecuados incluyen trehalosa y lactosa. Se pueden incluir agentes de relleno para una forma de dosificación liofilizada, principalmente entre aproximadamente 1% y aproximadamente 10% de manitol (con preferencia, entre aproximadamente 2% y aproximadamente 4%). Se pueden usar estabilizadores en formas de dosificación líquidas y liofilizadas, principalmente entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 50 mM de L-metionina (preferentemente entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 10 mM). Otros agentes de relleno adecuados incluyen glicina, arginina, que se pueden incluir como polisorbato-80 entre aproximadamente 0% y aproximadamente 0,05% (preferentemente entre aproximadamente 0,005% y aproximadamente 0,01%). Los agentes tensioactivos adicionales incluyen, en un sentido no taxativo, agentes tensioactivos de polisorbato 20 y los agentes tensioactivos BRIJ.

Las composiciones de utilidad para tratar la osteoartritis o el dolor de

acuerdo con la invención se pueden encontrar en una variedad de formas. Éstas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables y para infusión), dispersiones o suspensiones, tabletas, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma particular depende del modo de administración y la aplicación terapéutica pretendidas. Las composiciones típicas toman la forma de soluciones inyectables o para infusión, tales como composiciones similares a las que se usan para la inmunización pasiva de seres humanos con anticuerpos. El modo de administración es el parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una forma de realización, el anticuerpo se administra por infusión o inyección intravenosa. En otra forma de realización, el anticuerpo se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

Típicamente, las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables bajo las condiciones de elaboración y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una concentración elevada de droga. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación del compuesto activo (es decir, un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo) en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes de los que se enumeraron previamente, según se lo requiera, a lo que sigue una esterilización por filtración. Por lo general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes que

necesarios enumerados con anterioridad. En el caso de los polvos estériles y los liofilizados para la preparación de soluciones inyectables estériles, los ejemplos de métodos de preparación comprenden secado bajo vacío y secado por aspersión, que proporciona un polvo del ingrediente activo, más cualquier ingrediente adicional que se desee, a partir de una solución de previamente esterilizada por filtración de la misma. La fluidez apropiada de una solución se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión, y mediante el uso de agentes tensioactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede efectuar incluyendo en la composición un agente que demora la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las proteínas de unión de utilidad para tratar la osteoartritis o el dolor de acuerdo con la invención se pueden administrar mediante una variedad de métodos conocidos en el arte, aunque un ejemplo de ruta/modo de administración comprende una inyección subcutánea, una inyección intravenosa o una infusión. Como podrá apreciar el especialista, la ruta y/o el modo de administración varían dependiendo de los resultados deseados. En determinadas formas de realización, la o las proteínas de unión se pueden preparar con un vehículo que protegerá a dichas proteínas de unión contra una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsuladas. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tal como acetato de etilenvinilo,

polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o son conocidos en general por los especialistas en el arte. Véase, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, editor, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

En determinadas formas de realización, la proteína de unión de utilidad en la invención puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. Las proteínas de unión (y otros ingredientes, si se desea) también se pueden incluir en cápsulas de gelatina dura o blanda, presionar en comprimidos o incorporar directamente a la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica oral, los compuestos se pueden incorporar con excipientes y usar en forma de tabletas masticables, tabletas para disolución bucal, comprimidos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y semejantes. Para administrar un compuesto de la invención por otra vía que no sea la parenteral puede ser necesario recubrir el compuesto o coadministrar el compuesto con un material que impida su inactivación.

También se pueden incorporar compuestos activos adicionales en las composiciones. En determinadas formas de realización, una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo), o una porción de unión al antígeno de la misma, de utilidad en la invención se co-formula y/o se co-administra con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para tratar la osteoartritis o el dolor. Por ejemplo, una proteína de unión que se une a la hIL-1 α y/o a la hIL-1 β , o porciones de unión al antígeno de la misma, se puede co-formular y/o co-administrar con

uno o más anticuerpos adicional que se unen a otros blancos (por ejemplo, anticuerpos que se unen a otras citoquinas o que se unen a moléculas de la superficie celular). Aún más, se puede usar una o más proteínas de unión en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Dichas terapias combinadas pueden emplear ventajosamente dosificaciones menores de los agentes terapéuticos administrados, evitando de esa manera las posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

En determinadas formas de realización, una proteína que se une a la IL-1 α y/o a la IL-1 β , o a una porción de unión de la misma, se puede unir a un vehículo que prolonga la vida media conocido en el arte. Dichos vehículos incluyen, pero en un sentido no taxativo, el dominio Fc, polietilenglicol y dextrano. Dichos vehículos se describen, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N°: 6.660.843.

En una forma de realización específica, se administran moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican uno o más polipéptidos de una proteína de unión para tratar, prevenir, manejar o aliviar la osteoartritis por medio de una terapia genética. La terapia de genes hace referencia a una terapia que comprende la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o que puede expresarse. En esta forma de realización de la invención, los ácidos nucleicos producen sus polipéptidos de unión codificados de la o las proteínas de unión que se unen a la IL-1 α y/o a la IL-1 β e intervienen en el efecto profiláctico o terapéutico para osteoartritis o dolor.

Se puede usar cualquiera de los métodos de terapia de genes disponibles en el arte de acuerdo con la presente invención. Por revisiones generales de los

métodos de terapias génicas, véase Goldspiel et al., (1993) *Clin. Pharm.* 12: 488-505; Wu y Wu (1991) *Biotherapy* 3: 87-95; Tolstoshev (1993) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573-596; Mulligan (1993) *Science* 260: 926-932; y Morgan y Anderson (1993) *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217; Robinson, C. (1993) *Trends Biotechnol.*, 11(5): 155. Los métodos conocidos comúnmente en el arte de la tecnología de ADN recombinante que también se pueden usar en la presente invención se describen en Ausubel et al., (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Nueva York, 1993); y Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, (Stockton Press, Nueva York, 1990). Se divulgan descripciones detalladas de diversos métodos de terapia génica en la publicación de la Solicitud de Patente de los EE.UU. N°: 2005/0042664.

Una proteína de unión que se une a la IL-1 α y/o a la IL-1 β se puede usar sola o en combinación con uno o más agentes adicionales de utilidad en el tratamiento de osteoartritis o dolor. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en el arte por su utilidad para tratar uno o más síntomas de osteoartritis, o para afectar a un blanco distinto de IL-1, que está asociado con el dolor. El agente adicional también puede ser un agente que confiere un atributo benéfico a la composición terapéutica por ejemplo, un agente que afecta la viscosidad de la composición que será administrada a un individuo.

También se debería comprender que las combinaciones que se van a incluir en la presente invención son aquellas combinaciones útiles para el propósito que se le desea dar. Los agentes que se establecen más adelante se

dan con propósitos de ilustración y no con intención de ser taxativos. Las combinaciones, que forman parte de esta invención, pueden comprender las proteínas de unión que se unen a la IL-1 α y/o a la IL-1 β y por lo menos un agente adicional que proporcione una propiedad deseable. La combinación también puede incluir más de un agente adicional, por ejemplo, dos o tres agentes adicionales, si la combinación es tal que la composición que se forma puede llevar a cabo la función que se le ha destinado. Las combinaciones preferidas para tratar la osteoartritis o el dolor incluyen drogas anti-inflamatorias no esteroides también conocidas como "NSAIDS", que incluyen drogas como ibuprofeno. Otras combinaciones preferidas son agentes anti-inflamatorio, incluyendo corticosteroides tal como la prednisolona; los bien conocidos efectos secundarios del uso de esteroides se pueden reducir o incluso eliminar disminuyendo la dosis requerida de esteroides cuando los pacientes son tratados con una combinación que incluye una proteína de unión que se une a la IL-1 α y/o a la IL-1 β . Los ejemplos no taxativos de agentes terapéuticos para su uso en el tratamiento de un individuo que sufre de osteoartritis o dolor pueden incluir, pero en un sentido no taxativo, uno o más de los siguientes: budenosida, factor de crecimiento epidérmico, corticosteroides, ciclosporina, sulfasalazina, aminosalicilatos, 6-mercaptopurina, azatioprina, metronidazol, inhibidores de lipoxigenasa, mesalamina, olsalazina, balsalazida, antioxidantes, inhibidores de tromboxano, antagonistas del receptor de IL-1, anticuerpos monoclonales anti-IL-10, anticuerpos monoclonales anti-IL-6, factores de crecimiento, inhibidores de elastasa, compuestos de piridinil-imidazol, anticuerpos o agonistas de TNF, LT, IL-

1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-23, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF, anticuerpos de CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos, metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetil, leflunomida, NSAID, ibuprofeno, corticosteroides, prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, IRAK, NIK, IKK, p38, inhibidores de MAP quinasa, inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 β , inhibidores de la enzima convertidora de TNF α , inhibidores de la señalización de células T, inhibidores de metaloproteinasas, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores solubles de citoquinas, receptor soluble de p55 TNF, receptor soluble de p75 TNF, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, citoquinas antiinflamatorias, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGF β .

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de una o más proteínas de unión que se unen a la IL-1 α y/o a la IL-1 β . Una "cantidad terapéuticamente eficaz" hace referencia a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y por los períodos de tiempo necesarios, para obtener el resultado terapéutico deseado. Los especialistas en el arte podrán determinar la cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de unión, la cual puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y peso del individuo, y la capacidad de la proteína de unión de generar la respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es aquella en la

que cualquier efecto tóxico o perjudicial de las proteínas de unión, o de porciones de las mismas, es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y por los períodos de tiempo necesarios para obtener el resultado profiláctico deseado, tal como para prevenir una degeneración adicional o la pérdida de cartílago de las articulaciones en una articulación afectada por osteoartritis o para prevenir el comienzo o la intensificación del dolor. Típicamente, dado que se usa una dosis profiláctica en los sujetos antes o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

En una forma de realización, se provee un método para tratar a un individuo por dolor, en donde dicho individuo sufre de una enfermedad o trastorno asociado con la acumulación de IL-1. Dicha acumulación de IL-1 en un individuo puede ser el resultado de una expresión reducida de IL-1 o de un metabolismo reducido de IL-1. La acumulación de IL-1 puede ser en la sangre (incluyendo plasma, suero) o en un tejido local del individuo.

En una forma de realización, la invención provee un método para tratar a un individuo por dolor, en donde el individuo sufre de una enfermedad o trastorno asociado con la acumulación de IL-1.

En una forma de realización, las composiciones y los métodos que se describen en la presente se pueden usar para tratar el dolor en un individuo que sufre de una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que comprende osteoartritis, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, artritis séptica, artritis de

Lyme, artritis psoriática, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de intestino inflamatoria, diabetes mellitus dependiente de insulina, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, dermatitis, escleroderma, enfermedad de injerto versus huésped, rechazo de trasplante de órganos, enfermedad inmune aguda o crónica asociada con el trasplante de órganos, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schoenlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis crónica activa, uveítis, shock séptico, síndrome de shock tóxico, síndrome de sepsis, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasitarias, mielitis transversa aguda, corea de Huntington, mal de Parkinson, mal de Alzheimer, accidente cerebrovascular, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, formas malignas, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, enfermedad de Addison, deficiencia poliglandular tipo I esporádica, deficiencia poliglandular tipo II (síndrome de Schmidt), síndrome de dificultad respiratoria de adultos (agudo), alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía psoriática, artropatía colítica ulcerosa, sinovitis enteropática, artropatía asociada con *Chlamydia*, artropatía asociada con *Yersinia*, artropatía asociada con *Salmonella*, espondiloartropatía, enfermedad ateromatosa/arterioesclerosis, alergia atópica, enfermedad bullosa autoinmune, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, pénfigoide, enfermedad por IgA lineal, anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica

Coombs positiva, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis miálgica/enfermedad *Royal Free*, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de células gigantes, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmune criptogénica, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, enfermedades relacionadas con la inmunodeficiencia adquirida, hepatitis B, hepatitis C, inmunodeficiencia común variada (hipogammaglobulinemia variable común), cardiomiopatía dilatada, esterilidad femenina, insuficiencia ovárica, insuficiencia ovárica prematura, enfermedad pulmonar fibrótica, alveolitis fibrosante criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial post-inflamatoria, pneumonitis intersticial, enfermedad pulmonar intersticial asociada con enfermedades del tejido conectivo, enfermedad pulmonar asociada con enfermedades del tejido conectivo mixtas, enfermedad pulmonar intersticial asociada con esclerosis sistémica, enfermedad pulmonar intersticial asociada con artritis reumática, enfermedad pulmonar asociada con lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar asociada con dermatomiositis/polimiositis, enfermedad pulmonar asociada con la enfermedad de Sjogren, enfermedad pulmonar asociada con espondilitis anquilosante, enfermedad pulmonar difusa vasculítica, enfermedad pulmonar asociada con hemosiderosis, enfermedad pulmonar intersticial inducida por drogas, fibrosis, fibrosis por radiación, bronquiolitis obliterans, neumonía eosinofílica crónica, enfermedad pulmonar linfocítica infiltrante, enfermedad pulmonar intersticial postinfecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmune, hepatitis autoinmune tipo-1 (hepatitis autoinmune o lupoide clásica), hepatitis autoinmune tipo-2 (hepatitis por anticuerpo anti-LKM), hipoglucemia autoinmune, resistencia a

insulina tipo B con acantosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad inmune aguda asociada con el transplante de órganos, enfermedad inmune crónica asociada con el transplante de órganos, osteoartritis, colangitis esclerosante primaria, psoriasis tipo 1, psoriasis tipo 2, leucopenia idiopática, neutropenia autoinmune, enfermedad renal NOS, glomerulonefritis, vasculitis microscópica de los riñones, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso discoide, esterilidad masculina idiopática o NOS, autoinmunidad del esperma, esclerosis múltiple (todos los subtipos), oftalmia simpática, hipertensión pulmonar secundaria a una enfermedad del tejido conectivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nodosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumática, enfermedad de Still, esclerosis sistémica, síndrome de Sjorgren, enfermedad/arteritis de Takayasu, trombocitopenia autoinmune, trombocitopenia idiopática, enfermedad tiroide autoinmune, hipertiroidismo, hipotiroidismo autoinmune bocioso (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmune atrófico, mixedema primaria, uveítis facogénica, vasculitis primaria, vitiligo, enfermedad hepática aguda, enfermedad hepática crónica, cirrosis alcohólica, daño hepático inducido por alcohol, colestasis, enfermedad hepática idiosincrática, hepatitis inducida por drogas, esteatohepatitis no alcohólica, alergia, infección por estreptococos grupo B (GBS), trastornos mentales (por ejemplo, depresión y esquizofrenia), enfermedades mediadas por tipo Th2 y tipo Th1, dolor agudo y crónico (diferentes formas de dolor), distintos tipos de cáncer tales como cáncer de pulmón, mama, estómago, vejiga, colon, páncreas, ovario, próstata y rectal y formas malignas hematopoyéticas (leucemia y linfoma),

abetalipoproteinemia, acrocianosis, procesos parasitarios o infecciosos agudos y crónicos, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), infección bacteriana aguda o crónica, pancreatitis aguda, insuficiencia renal aguda, adenocarcinomas, latidos ectópicos atriales, complejo de demencia del SIDA, hepatitis inducida por alcohol, conjuntivitis alérgica, dermatitis por contacto alérgica, rinitis alérgica, rechazo a aloinjertos, déficit de alfa-1-antitripsina, esclerosis lateral amiotrófica, anemia, angina pectoris, degeneración de células del asta anterior, terapia anti-CD3, síndrome antifosfolípido, reacciones de hipersensibilidad anti-receptor, aneurismas aórticos y periféricos, disección aórtica, hipertensión arterial, arterioesclerosis, fístula arteriovenosa, ataxia, fibrilación auricular (sostenida o paroxística), taquicardia auricular, bloqueo aurículoventricular, linfoma de células B, rechazo de injerto óseo, rechazo de trasplante de médula ósea (BMT), bloqueo de ramas de haz de His, linfoma de Burkitt, acidez estomacal, arritmias cardíacas, síndrome de *atontamiento* cardíaco, tumores cardíacos, cardiomiopatía, respuesta de inflamación a una derivación [*bypass*] cardiopulmonar, rechazo al trasplante de cartílago, degeneraciones de la corteza del cerebelo, trastornos del cerebelo, taquicardia auricular caótica o multifocal, trastornos asociados con una quimioterapia, leucemia mielocítica crónica (CML), alcoholismo crónico, patologías inflamatorias crónicas, leucemia linfocítica crónica (CLL), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), intoxicación crónica por salicilato, carcinoma colorrectal, insuficiencia cardíaca congestiva, conjuntivitis, dermatitis por contacto, cor pulmonale, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad de Creutzfeldt-

Jakob, sepsis con cultivo negativo, fibrosis quística, trastornos asociados con una terapia con citoquinas, demencia pugilística, enfermedades desmielinizantes, fiebre hemorrágica del dengue, dermatitis, condiciones dermatológicas, diabetes, enfermedad aterosclerótica diabética, enfermedad de cuerpos difusos de Lewy, cardiomiopatía congestiva dilatada, trastornos del ganglio basal, síndrome de Down en la edad madura, trastornos del movimiento inducidos por drogas que bloquean los receptores de dopamina del CNS, sensibilidad a drogas, eczema, encefalomielitis, endocarditis, endocrinopatía, epiglotitis, infección por el virus Epstein-Barr, eritromelalgia, trastornos extrapiramidales y del cerebelo, linfocitosis hematofagocítica familiar, rechazo al implante de timo fetal, ataxia de Friedreich, trastornos funcionales de las arterias periféricas, sepsis fúngicas, gangrena gaseosa, úlcera gástrica, nefritis glomerular, rechazo a injertos de cualquier órgano o tejido, sepsis Gram-negativa, sepsis Gram-positiva, granulomas debidos a organismos intracelulares, leucemia de células pilosas, enfermedad de Hallervorden-Spatz, tiroiditis de Hashimoto, fiebre del heno, rechazo al transplante de corazón, hemacromatosis, hemodiálisis, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombótica, hemorragia, hepatitis A, arritmias del haz de His, infección por VIH/neuropatía por VIH, enfermedad de Hodgkin, trastornos de movimientos hiperquinéticos, reacciones de hipersensibilidad, pneumonitis por hipersensibilidad, hipertensión, trastornos de movimientos hipoquinéticos, evaluación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, enfermedad de Addison idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, citotoxicidad mediada por anticuerpos, astenia, atrofia muscular espinal infantil, inflamación de

la aorta, influenza A, exposición a radiación ionizante, iridociclitis/uveítis/neuritis óptica, lesiones por reperfusión isquémica, accidente cerebrovascular isquémico, artritis reumática juvenil, atrofia muscular espinal juvenil, sarcoma de Kaposi, rechazo al trasplante de riñón, legionella, leishmaniasis, lepra, lesiones del sistema corticoespinal, lipedema, rechazo al trasplante de hígado, linfedema, malaria, linfoma maligno, histiocitosis maligna, melanoma maligno, meningitis, meningococcemia, metabólica/idiopática, migraña cefalea, trastorno mitocondrial multisistémico, enfermedad del tejido conectivo mixto, gammopatía monoclonal, mieloma múltiple, degeneraciones de múltiples sistemas (Mencel, Dejerine-Thomas, Shi-Drager y Machado-Joseph), miastenia grave, *Mycobacterium avium intracellulare*, *Mycobacterium tuberculosis*, síndrome mielodiplástico, infarto de miocardio, trastornos isquémicos del miocardio, carcinoma nasofaríngeo, enfermedad pulmonar neonatal crónica, nefritis, nefrosis, enfermedades neurodegenerativas, atrofas musculares neurogénicas, fiebre neutropénica, linfoma no Hodgkins, oclusión de la aorta abdominal y sus ramas, trastornos arteriales oclusivos, terapia con OKT3®, orquitis/epididimitis, procedimientos de reversión de orquitis/vasectomía, organomegalia, osteoporosis, rechazo al trasplante de páncreas, carcinoma pancreático, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia maligna, rechazo al trasplante de paratiroides, enfermedad inflamatoria pélvica, rinitis perenne, enfermedad del pericardio, enfermedad aterosclerótica periférica, trastornos vasculares periféricos, peritonitis, anemia perniciosa, neumonía por *Pneumocystis carinii*, neumonía, síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammopatía monoclonal

y síndrome de cambios de piel), síndrome de post-perfusión, síndrome postbomba, síndrome de cardiectomía post-MI, preeclampsia, parálisis supranuclear progresiva, hipertensión pulmonar primaria, terapia de radiación, fenómeno de Raynaud, enfermedad de Raynaud, enfermedad de Refsum, taquicardia por QRS estrecho regular, hipertensión renovascular, lesión por reperfusión, cardiomiopatía restrictiva, sarcomas, corea senil, demencia senil de tipo cuerpo de Lewy, artropatías seronegativas, shock, anemia de células falsiformes, rechazo de aloinjertos de piel, síndrome de cambios de piel, rechazo al trasplante de intestino delgado, tumores sólidos, arritmias específicas, ataxia espinal, degeneraciones espinocerebelosas, miositis estreptococcica, lesiones estructurales del cerebelo, panencefalitis esclerosante subaguda, síncope, sífilis del sistema cardiovascular, anafilaxia sistémica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, artritis reumática juvenil de comienzo sistémico, ALL por células T o FAB, telangiectasia, tromboangitis obliterans, trombocitopenia, toxicidad, trasplantes, traumatismo/hemorragia, reacciones de hipersensibilidad tipo III, hipersensibilidad de tipo IV, angina inestable, uremia, urosepsis, urticaria, enfermedades de las válvulas cardíacas, venas varicosas, vasculitis, enfermedades venosas, trombosis venosa, fibrilación ventricular, infecciones virales y fúngicas, encefalitis viral/meningitis aséptica, síndrome hemafagocítico asociado a virus, síndrome de Wernicke-Korsakoff, síndrome de Wilson, rechazo a xenoinjertos de cualquier órgano o tejido, síndromes coronarios agudos, polineuritis idiopática aguda, polirradiculopatía inflamatoria desmielinizante aguda, isquemia aguda, enfermedad de Still del adulto, *Alopecia areata*, anafilaxis,

síndrome de anticuerpo antifosfolípido, anemia aplásica, arteriosclerosis, eczema atópico, dermatitis atópica, dermatitis autoinmune, trastorno autoinmune asociado con una infección por estreptococo, enteropatía autoinmune, síndrome de pérdida de la audición autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS), miocarditis autoinmune, insuficiencia ovárica prematura autoinmune, blefaritis, bronquiectasias, penfigoide bulloso, enfermedad cardiovascular, síndrome antifosfolípido catastrófico, enfermedad celíaca, espondilosis cervical, isquemia crónica, penfigoide cicatricial, síndrome clínicamente aislado (CIS) con riesgo de esclerosis múltiple, conjuntivitis, trastorno psiquiátrico en la niñez, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), dacriocistitis, dermatomiositis, retinopatía diabética, hernia de disco, prolapso de disco, anemia hemolítica inmune inducida por drogas, endocarditis, endometriosis, endoftalmitis, episcleritis, eritema multiforme, eritema multiforme mayor, penfigoide gestacional, síndrome de Guillain-Barre (GBS), fiebre del heno, síndrome de Hughes, enfermedad de Parkinson idiopática, neumonía intersticial idiopática, alergia mediada por IgE, anemia hemolítica inmune, miositis por cuerpos de inclusión, enfermedad inflamatoria infecciosa ocular, enfermedad inflamatoria desmielinizante, enfermedad inflamatoria del corazón, enfermedad inflamatoria del riñón, IPF/UIP, iritis, queratitis, queratoconjuntivitis seca, enfermedad de Kussmaul o enfermedad de Kussmaul-Meier, parálisis de Landry, histiocitosis de las células de Langerhans, *Livido reticularis*, poliangitis microscópica con degeneración macular, morbus Bechterev, trastorno neuronal motor, penfigoide de la membrana mucosa, insuficiencia multiorgánica, miastenia gravis, síndrome mielodisplásico,

miocarditis, trastornos de las raíces nerviosas, neuropatía, hepatitis no-A no-B, neuritis óptica, osteolisis, cáncer de ovario, JRA pauciarticular, enfermedad oclusiva arterial periférica (PAOD), enfermedad vascular periférica (PVD), enfermedad arterial periférica (PAD), flebitis, poliarteritis nodosa (o periarteritis nodosa), policondritis, polimialgia reumática, poliosis, JRA Poliarticular, síndrome de deficiencia poliendócrina, polimiositis, polimialgia reumática (PMR), síndrome de post-bomba, parkinsonismo primario, cáncer de próstata y rectal y formas malignas hematopoyéticas (leucemia y linfoma), prostatitis, aplasia de glóbulos rojos pura, insuficiencia adrenal primaria, neuromielitis óptica recurrente, restenosis, enfermedad del corazón reumático, SAPHO (sinovitis, acne, pustulosis, hiperostosis y osteitis), amiloidosis secundaria, pulmón de shock, escleritis, ciática, insuficiencia adrenal secundaria, enfermedad del tejido conectivo asociada a siliconas, dermatosis de Sneddon-Wilkinson, espondilitis anquilosante, síndrome de Stevens-Johnson (SJS), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, arteritis temporal, retinitis toxoplásmica, necrólisis epidérmica tóxica, mielitis transversa, TRAPS (síndrome periódico asociado al receptor del factor de necrosis tumoral), reacción alérgica de Tipo 1, diabetes de Tipo II, urticaria, neumonía intersticial usual (UIP), vasculitis, conjuntivitis vernal, retinitis viral, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (síndrome VKH), degeneración macular húmeda y cicatrización de heridas.

Las composiciones y los métodos que se describen en la presente se pueden usar para tratar el dolor en un individuo que sufre de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste de cánceres primarios y metastáticos,

incluyendo carcinomas de mama, colon, recto, pulmón, orofaringe, hipofaringe, esófago, estómago, páncreas, hígado, vesícula biliar y conductos biliares, intestino delgado, tracto urinario (incluyendo riñón, vejiga y urotelio), tracto genital femenino (incluyendo cuello uterino, útero y ovarios, y también el coriocarcinoma y la enfermedad trofoblástica gestacional), tracto genital masculino (incluyendo próstata, vesículas seminales, testículos y tumores de las células germinales), glándulas endocrinas (incluyendo las glándulas tiroides, adrenal y pituitaria), y piel, así como hemangiomas, melanomas, sarcomas (incluyendo los que surgen de tejidos óseos y blandos, y también el sarcoma de Kaposi), tumores de cerebro, los nervios, los ojos y las meninges (incluyendo astrocitomas, gliomas, glioblastomas, retinoblastomas, neuromas, neuroblastomas, Schwannomas y meningiomas), tumores sólidos que surgen de tumores malignos hematopoyéticos, tales como leucemias y linfomas (linfomas de Hodgkin y no Hodgkin).

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proveer la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). A modo de ejemplo, es posible administrar un solo bolo, es posible administrar varias dosis divididas durante un período de tiempo determinado o es posible reducir o incrementar la dosis de manera proporcional, en función de las exigencias de la situación terapéutica. Resulta especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en una forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y mayor uniformidad de dosificación. La forma de dosificación individual, según se usa en la presente, hace referencia a unidades físicamente discretas, apropiadas para dosificaciones individuales en los sujetos mamíferos a tratar; donde cada

unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico que se requiera. La especificación para las formas de dosificación unitarias de la invención está dictada y depende directamente de (a) las características únicas de la o las proteínas de unión que se unen a la IL-1 α y/o a la IL-1 β y el efecto terapéutico o profiláctico particular que se desea lograr, y (b) las limitaciones inherentes en el arte de conformar compuestos con tales proteínas para el tratamiento de individuos.

A modo de ejemplo, un rango no taxativo para una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de una proteína de unión de utilidad en el tratamiento de osteoartritis o dolor es de 0,1-20 mg/kg, más preferiblemente de 1-10 mg/kg. Se debe tener en cuenta que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la severidad de la afección a aliviar. También se comprenderá que, para un sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos se deben ajustar en el transcurso del tiempo, de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional del encargado de administrar o supervisar la administración de las composiciones, y que los rangos de dosificación que se indican en la presente solamente se presentan a modo de ejemplo y no han de limitar el alcance o la práctica de la composición que se reivindica.

Para los especialistas en el arte será fácilmente evidente que son obvias otras modificaciones y adaptaciones apropiadas para los métodos y las composiciones de la invención que se describen en la presente, y que dichos métodos también pueden llevarse a cabo usando equivalentes apropiados, sin

alejarse del alcance de la invención o las formas de realización que se detallan en la presente. Habiéndose descrito la presente invención en detalle, ésta podrá comprenderse más claramente con referencia a los siguientes ejemplos, que solamente se incluyen con fines ilustrativos y no pretenden limitar la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. Generación de proteínas de dominios variables duales de inmunoglobulina (DVD-Ig)

La molécula de inmunoglobulina con dominio variable dual (DVD-Ig) se diseña de tal modo que se asocian en tándem dos dominios variables de cadena liviana (VL) diferentes provenientes de los dos mAbs parentales diferentes en forma directa o a través de un conector corto mediante técnicas de ADN recombinante, seguidos por un dominio constante de cadena liviana. De manera similar, la cadena pesada comprende dos dominios variables de la cadena pesada (VH) diferentes asociados en tándem, directamente o por medio de un conector, seguidos por un dominio constante CH1 y una región Fc. Véase la Figura 1A. El diseño y la producción de proteínas de unión DVD-Ig a partir de anticuerpos monoclonales parentales, incluyendo ejemplos de una proteína de unión DVD-Ig que se une a la IL-1 α y a la IL-1 β producidos a partir de un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α parental y un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β parental, ya fueron descritos. Véase, la publicación PCT N° WO 2007/024715 A2 y Wu et al., *Nature Biotechnol.*, 25(11): 1290-1297 (2007), incorporadas en la presente a modo de referencia. En la presente se proveen descripciones de anticuerpos monoclonales seleccionados contra la IL-1 α y la IL-1 β y su uso como anticuerpos monoclonales

parentales para la producción de las moléculas de DVD-Ig que se unen a ambas IL-1 α e IL-1 β . Las moléculas DVD-Ig fueron caracterizadas por su posible actividad terapéutica usando modelos conocidos en animales de artritis reumatoide y osteoartritis.

Ejemplo 1.1. Generación de anticuerpos monoclonales de murinos contra la IL-1 α y la IL-1 β

Se generaron anticuerpos monoclonales (mAbs) contra la IL-1 α y la IL-1 β como se describe a continuación usando tecnología de hibridomas estándar.

Ejemplo 1.1.A. Inmunización de ratones

Se uso la IL-1 α humana recombinante purificada y la IL-1 β de murino purificada (R&D Systems) como inmunógenos, así como antígenos de recubrimiento en ensayos de titulación y ELISA de selección. Las dosificaciones inmunizantes variaron en un rango entre 5,0 y 20,0 μ g/ratón/inyección para todos los antígenos, en inmunizaciones primarios y de refuerzo. El adyuvante ImmunEasy se obtuvo de Qiagen (Waltham, MA) y se usó con una relación de adyuvante/antígeno de 20 ml de adyuvante ImmunEasy por 10,0 μ g de antígeno. Cada grupo de animales a inmunizar contenía cinco ratones KO para la IL-1 α β gentileza del Dr. Yoichiro Iwakura (Universidad de Tokio, Minato-ku, Tokio, Japón). Los ratones fueron inmunizados de acuerdo con el programa de dosificación que se describe a continuación. Las células MRC-5 se obtuvieron de ATCC (Manassas, VA) y se usaron para el bioensayo con IL-1. Los conjuntos de elementos del ELISA para la IL-8 humana y los anticuerpos anti-hIL-1 α y anti-hIL-1 β de ratón de control (MAB200 y MAB201) se obtuvieron de R&D Systems

(Minneapolis, MN).

Brevemente, se preparó una mezcla de adyuvante-antígeno mezclando primero suavemente el adyuvante en un vial usando un agitador por vortexeo. Se retiró la cantidad deseada de adyuvante del vial y se introdujo en un tubo para microcentrifuga de 1,5 ml esterilizado en autoclave. El antígeno se preparó en PBS o salina con una concentración que varía en un rango de 0,5-1,0 mg/ml. Luego se agregó la cantidad calculada de antígeno al tubo para microcentrifuga con el adyuvante y la solución se mezcló pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 5 veces. La mezcla de adyuvante-antígeno se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se mezcló nuevamente pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 5 veces. La solución de adyuvante-antígeno se extrajo en la jeringa apropiada para la inyección en animales. Se inyectó un total de 5-20 μ g de antígeno en un volumen de 50-100 μ l. Se inmunizó cada animal y luego se administró un refuerzo 2 a 3 veces dependiendo del título. A los animales con títulos buenos se les administro un refuerzo intravenoso final antes de la fusión y la generación de hibridomas.

Ejemplo 1.1.B. Selección de hibridomas

Se seleccionaron los hibridomas, generados como se describió previamente, y se determinó el título de anticuerpos usando un ELISA. Los antígenos proteicos se usaron para recubrir directamente placas de ELISA y detectar los anticuerpos específicos usando procedimientos de ELISA estándar. Brevemente, se recubrieron placas para ELISA con 100 μ l de ya sea rhIL-1 α o rhIL-1 β (1,0 μ g/ml en PBS) durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron 3 veces

con 250 μ l de PBS/Tween₂₀ 0,5% y se bloquearon con 200 μ l de solución amortiguadora de bloqueo (BSA 2% en PBS con Tween₂₀ 0,5%). Se agregó suero o sobrenadante de hibridomas diluido (100 μ l) a cada cavidad y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween₂₀ 0,5%. Se usó IgG anti-murino de cabra conjugado con HRP para la detección y las DO de la unión se observaron a 450 nm. Los clones de hibridomas productores de anticuerpos que mostraron una gran actividad de unión específica en el ELISA se subclonaron y se purificaron, y se caracterizó la afinidad (Biacore) y la potencia (bioensayo con MRC-5) de los anticuerpos como se describe a continuación.

Ejemplo 1.1.C. Caracterización de anticuerpos monoclonales de murinos contra la IL-1 α y la IL-1 β

Se usaron los siguientes ensayos para caracterizar los anticuerpos producidos por los hibridomas descritos en el Ejemplo 1.1.B.

Ejemplo 1.1.C.1. Resonancia de plasmón superficial

Las interacciones de unión en tiempo real entre el anticuerpo (anticuerpo anti-mIL-1 recombinante de ratón) capturado en una matriz biosensora por la IgG anti-ratón de cabra y rmlL-1 se midieron por resonancia de plasmón superficial (SPR) usando el sistema BIAcore (Biacore AB, Uppsala, Suecia) de acuerdo con las instrucciones del proveedor y procedimientos estándar. Brevemente, se diluyó rmlL-1 en solución amortiguadora de corrida HBS (Biacore AB) y se inyectaron alícuotas de 50 μ l a través de las matrices de proteína inmovilizada a una velocidad de flujo de 5 ml/minuto. Las concentraciones de rhIL-1 empleadas

fueron 62,5, 125, 187,5, 250, 375, 500, 750, 1000, 1500 y 2000 nM. Para determinar la constante de disociación (disociación), la constante de asociación (asociación), se usó el software de evaluación cinética BIAcore (versión 3.1).

Ejemplo 1.1.C.2. Bioensayo anti-IL-1

La línea celular MRC-5 es una línea celular de fibroblastos de pulmón humana que produce IL-8 como respuesta a la IL-1 α y a la IL-1 β humana de una manera dependiente de la dosis (véase, Dinarello, Muegge y Durum (2000) *Curr. Protocols Immunol.*, 6: 1). Se cultivaron células MRC-5 en FBS completo 10% MEM y se hicieron crecer a 37°C en un incubador con CO₂ 5%. Para determinar las potencias neutralizantes de los anticuerpos monoclonales (mAbs) contra la IL-1 α o la IL-1 β humana recombinante, se agregaron concentraciones diferentes (0-10 μ g/ml) de mAb (50 μ l) a una placa de 96 cavidades y se preincubaron con 50 μ l de rhIL-1 α o rhIL-1 β (10-50 pg/ml) durante 1 hora a 37°C. Los sobrenadantes se cosecharon, se diluyeron y se midieron las concentraciones de IL-8 por un ELISA usando un conjunto de elementos de ELISA para IL-8 estándar (R&D Systems). La potencia del anticuerpo se determinó por su capacidad para inhibir la producción de IL-8 en las células MRC-5.

Sobre la base del bioensayo con Biacore y MRC-5, se identificó una cantidad de anticuerpos anti-hIL-1 α y anti-hIL-1 β de murinos con gran afinidad y potencia, como se muestra en la siguiente Tabla 1:

Tabla 1. Generación y caracterización de mAbs anti-hIL-1 α / β de murinos

N° de clon	Especificidad	KD (M)	IC₅₀ (M)
-------------------	----------------------	---------------	----------------------------

de mAb ad

3D12.E3	hIL-1 α	$1,11 \times 10^{-9}$	$6,70 \times 10^{-10}$
18F4.2C8	hIL-1 α	$5,78 \times 10^{-10}$	$8,90 \times 10^{-11}$
6H3.1A4.3	hIL-1 α	$3,54 \times 10^{-10}$	$2,40 \times 10^{-10}$
E11			
13F5.G5	hIL-1 β	$2,91 \times 10^{-10}$	$6,00 \times 10^{-10}$
1B12.4H4	hIL-1 β	$2,13 \times 10^{-10}$	$5,30 \times 10^{-10}$
6B12.4F6	hIL-1 β	$5,54 \times 10^{-10}$	$3,20 \times 10^{-10}$

Ejemplo 1.1.D. Clonación y secuenciación de los anticuerpos monoclonales (mAbs) de murinos contra la IL-1 α y la IL-1 β de murinos

La clonación y secuenciación de los genes de las regiones variable pesada (VH) y liviana (VL) de todos los mAbs anti-IL-1 α/β descritos en la Tabla 1 (antes) y de anticuerpos adicionales se llevaron a cabo después del aislamiento y la purificación del ARN total de cada línea celular de hibridoma usando el reactivo Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La amplificación de ambos genes VH y VL se llevó a cabo usando los oligonucleótidos IgGVH y IgkVL del conjunto de cebadores para Ig de ratón (Novagen, Madison, WI) con el conjunto de elementos para RT-PCR de un tubo (Qiagen) según la sugerencia del proveedor. Los fragmentos de ADN resultantes de las amplificaciones productivas se clonaron en el vector pCR-TOPO (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Luego se secuenciaron múltiple clones VH y VL con el método de terminación de cadenas

con dideoxi usando un secuenciador ABI 3000 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las secuencias de todos los genes VL y VH de los mAb se muestran en la siguiente Tabla 2.

TABLA 2. Anticuerpos monoclonales de murinos capaces de unirse a la IL-1 α o la IL-1 β humana

Proteína	N° de identificación de secuencias	Secuencia
		12345678901234567890
VH 3D12.E3	SEQ ID N°: 89	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTF RNYGMNWWVKQAPGKDLKRMWINTYTG ESTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNL KNEDTATYFCARGIYYYGSSYAMDYWGQ GTSVTVSS
VL 3D12.E3	SEQ ID N°: 90	NIQMTQTTSSLSASLGDRVITISCRASQDIS NCLNWWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVP SRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC QQGKTLPYAFGGGKLEINR
VH 18F4.2C8	SEQ ID N°: 91	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGLNI KDTYMHWLKQRPEQGLEWIGRIDPANGN AKYDPRFLGKATITADTSSNTAYLQLSSLT SEDTAVYYCARGDGNFHFHDYWGQGTTLT VSS

VL 18F4.2C8	SEQ ID N°: 92	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVSVTCKASQN VGTNIAWYQQKPGQSPRALIYSASYRYS GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSVDLAE YFCQQYTRYPLTFGGGKLEIKR
VH 6H3.1A4.3E11	SEQ ID N°: 93	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYT FTTYWMNWWVKQRPEQGLEWIGRIDPYDS ETLYSQKFKDTAILTVDKSSSTAYMQLSSL TSEDSAVYYCARYGFDYWGGGTTTLTVSS
VL 6H3.1A4.3E11	SEQ ID N°: 94	QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSSV NYMYWYQQKPRSSPKWIYLTSLNLSGV PARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYY CQQWNSNPYTFGGGKLEMKR
VH 13F5.G5	SEQ ID N°: 95	QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYA FSSYWMNWWVKQRPGQGLEWIGQIYPGD GDTNYNGKFKGKATLTADKSSSTSYMQL SGLTSEDSAMYFCVRFPTGNDYYAMDYW GQGTSVTVSS
VL 13F5.G5	SEQ ID N°: 96	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVD SYGNSYMHYQQKPGQPPKLLIYLASNL ESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDA ATYYCQQNNEPFTFGSGTKLEIKR
VH 1B12.4H4	SEQ ID N°: 97	QVHLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSL

		TDYGVSWIRQPPGKGLEWLGLIWGGGDT YYNSPLKSRLSIRKDNSKSQVFLKMNSLQ TDDTAVYYCAKQRTLWGYDLYGMDYWG QGTSVTVSS
VL 1B12.4H4	SEQ ID N°: 98	ETTVTQSPASLSMAIGEKVITIRCITSTDIDV DMNWyQQKPGEPKLLISQGNTLRPGVP SRFSSSGSGTDFVFIIENMLSEdVADYYCL QSDNLPLTFGAGTKLELKR
VH 6B12.4F6	SEQ ID N°: 99	EVQLQQSGPELVKTGTSVKISCKASGYSF TGYyMHWVRQSHGKSLEWIGYISCYNGF TSYNPKFKGKATFTVDTSSSTAYIQFSRLT SEdSAVYYCARSDYYGTNDYWGQGTTLT VSS
VL 6B12.4F6	SEQ ID N°: 100	QIVLTQSPAIMSASPGEKVITITCSASSSVS YMHWFQQKPGASPKLWIYSTSNLASGVP ARFSGSGSGTSYSLTVSRMEAEADAATYY CQQRSTYPYTFGGGTKLEIKR

Ejemplo 1.2. Generación y caracterización de anticuerpos quiméricos de murinos-humanos

Todos los mAbs descritos previamente fueron convertidos en anticuerpos quiméricos (con la región constante humana) y luego se expresaron, purificaron y caracterizaron para confirmar su actividad. Los anticuerpos también se usaron como controles en subsiguientes análisis de las proteínas de unión DVD-Ig. Para

convertir 3D12.E3 en una forma quimérica, se amplificó 3D12.E3-VL por PCR usando los cebadores P1 y P2; al mismo tiempo se amplificó el gen Ck humano (en el vector pBOS generado internamente, Abbott Bioresearch Center, Worcester, MA) usando los cebadores P3 y P4. Ambas reacciones de PCR se llevaron a cabo de acuerdo a procedimientos y técnicas de PCR estándar. Los dos productos de la PCR se purificaron por gel, y se usaron juntos como templados superpuestos para la subsiguiente reacción de PCR superpuesta usando los cebadores P1 y P4 bajo condiciones de PCR estándar. El producto final de la PCR, la cadena liviana quimérica 3D12.E3-VL-hCk, se subclonó en el vector de expresión pEF6 TOPO de mamífero (Invitrogen) por clonación TOPO de acuerdo con las instrucciones del proveedor. En la Tabla 3 se muestran las secuencias de cada uno de los cebadores para PCR usados en este procedimiento.

Tabla 3. Cebadores para PCR

P1: 5' ATG GTG TCC ACA GCT CAG TTC C 3'	SEQ ID Nº: 101
P2: 5' GC AGC CAC CGT ACG CCG GTT TAT TTC CAG 3'	SEQ ID Nº: 102
P3: 5' CGT ACG GTG GCT GCA CCA TCT GTC 3'	SEQ ID Nº: 103
P4: 5' TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GC 3'	SEQ ID Nº: 104

Para convertir la cadena pesada 3D12.E3 en una forma quimérica, se amplificó 3D12.E3-VH por PCR usando los cebadores P5 y P6; al mismo tiempo se amplificó el gen Cy1 humano (en el vector pBOS generado internamente en ABC) usando los cebadores P7 y P8. Ambas reacciones de PCR se llevaron a

cabo de acuerdo a procedimientos y técnicas de PCR estándar. Los dos productos de la PCR se purificaron por gel, y se usaron juntos como templados superpuestos para la subsiguiente reacción de PCR superpuesta usando los cebadores P5 y P8 bajo condiciones de PCR estándar. El producto final de la PCR, la cadena liviana quimérica 3D12.E3-VH-hCy1, se subclonó en el vector de expresión pcDNA3.1 TOPO de mamífero (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. En la Tabla 4 se muestran las secuencias de cada uno de los cebadores para PCR usados en este procedimiento.

Tabla 4. Cebadores para PCR

P5: 5' ATG GCT TGG GTG TGG ACC TTG C 3'	SEQ ID N°: 105
P6: 5' GGG CCC TTG GTC GAC GCT GAG GAG ACG GTG ACT GAG G 3'	SEQ ID N°: 106
P7: 5' GCG TCG ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC C 3'	SEQ ID N°: 107
P8: 5' TC ATT TAC CCG GAG ACA GGG AGA GGC 3'	SEQ ID N°: 108

De manera similar, se generó la cadena quimérica 13F5.G5-VH-Cy1 usando los cebadores P21/P22 (para VH) y P7/P8 (para hCy1) y se clonó en el vector pcDNA3.1 TOPO, y la cadena quimérica 13F5.G5-VL-Ck se generó usando los cebadores P23/P24 (para VL) y P3/P4 (para hCk) y se clonó en el vector pEF6 TOPO. En la Tabla 5 se muestran las secuencias de cada uno de los cebadores

para PCR usados en este procedimiento.

Tabla 5. Cebadores para PCR

P21: 5' ATA GAA TGG AGC TGG GTT TTC CTC 3'	SEQ ID Nº: 109
P22: 5' GGG CCC TTG GTC GAC GC TGA GGA GAC GGT GAC TGA 3'	SEQ ID Nº: 110
P23: 5' ATG GTC CTC ATG TCC TTG CTG TTC 3'	SEQ ID Nº: 111
P24: 5' GC AGC CAC CGT ACG CCG TTT TAT TTC CAG CTT TG 3'	SEQ ID Nº: 112

Para expresar los anticuerpos quiméricos, se co-expresaron las cadenas 13F5.G5-VL-C κ y 13F5.G5-VH-C γ 1 en células COS usando Lipofectamin (Invitrogen) por 72 horas, y se recolectó el medio y la IgG se purificó por cromatografía con la Proteína A. De manera similar, se co-expresaron las cadenas 13F5.G5-VL-C κ y 13F5.G5-VH-C γ 1 en células COS usando Lipofectamin (Invitrogen) por 72 horas, y se recolectó el medio y la IgG se purificó por cromatografía con la Proteína A. Ambos Abs quiméricos purificados fueron caracterizados con el bioensayo Biacore y MRC-5 para confirmar la actividad. Los resultados mostraron que estos Abs quiméricos presentaban una afinidad y potencia similares a las de los mAbs originales de murinos.

Ejemplo 1.3. Construcción, expresión y purificación de la molécula del dominio variable dual de inmunoglobulina (DVD-Ig) IL-1 α / β

La construcción usada para generar la proteína de unión DVD-Ig capaz de unirse a la hIL-1 α y hIL-1 β se ilustra en la Figura 1B. Brevemente, se obtuvieron mAbs parentales que incluyen dos anticuerpos murinos de gran afinidad, anti-hIL-1 α (clon 3D12.E3) y anti-hIL-1 β (clon 13F5.G5), por inmunización de ratones Balb/c con la proteína recombinante IL-1 α (rhIL-1 α) y con la proteína recombinante IL-1 β (rhIL-1 β), respectivamente. Los genes VL/VH de estos dos clones de hibridoma se aislaron por RT-PCR usando el conjunto de elementos de cebadores Ig de ratón (Novagen, Madison, WI). Los genes VL/VH fueron convertidos primero en anticuerpos quiméricos (con regiones constantes humanas) para confirmar la actividad y la potencia. Para generar la proteína de unión DVD1-Ig, se fusionaron la VH y la VL de 13F5.G5 con el extremo N-terminal de la VH y la VL de 3D12.E3, respectivamente (como se muestra en la Figura 1B). La proteína de unión DVD2-Ig se construyó de manera similar, excepto que tenía un conector entre los dos dominios variables en la cadena liviana (la secuencia conectora es ADAAP) y en la cadena pesada (la secuencia conectora es AKTTPP). Estas secuencias se seleccionaron entre secuencias Ck y CH1 N-terminales de murino. Estas secuencias conectoras, seleccionadas entre Ck y CH1 N-terminales de murino, son una extensión natural de los dominios variables y presentan una conformación flexible sin estructuras secundarias significativas basado en el análisis de varias estructuras cristalinas Fab. Los detalles de los procedimientos de clonación por PCR se describen a continuación.

Ejemplo 1.3.A. Clonación molecular de la proteína de unión DVD1-Ig hIL-1 α / β

La cadena 13F5.G5-VH se amplificó por PCR usando los cebadores P21 y P25. La cadena 3D12.E3-VH-hCy1 se amplificó usando los cebadores P14 y P8. Ambas reacciones de PCR se llevaron a cabo de acuerdo a procedimientos y técnicas de PCR estándar. Los dos productos de la PCR se purificaron por gel, y se usaron juntos como templados superpuestos para la subsiguiente reacción de PCR superpuesta usando los cebadores P21 y P8 bajo condiciones de PCR estándar. El producto final de la PCR, la cadena pesada de DVD1-Ig, hIL-1 α / β DVD1-VH-hCy1, se subclonó en el vector de expresión pcDNA3.1 TOPO de mamífero (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. En la Tabla 6 se muestran las secuencias de los cebadores para PCR usados en este procedimiento.

Tabla 6. Cebadores para PCR

P14: 5' CAG ATC CAG TTG GTG CAG TCT GG3'	SEQ ID N°: 113
P25: 5' CAC CAA CTG GAT CTG TGA GGA GAC GGT GAC TGA GG 3'	SEQ ID N°: 114

Para generar la cadena liviana hIL-1 α / β DVD1-Ig, se amplificó 13F5.G5-VL por PCR usando los cebadores P23 y P26; a mismo tiempo se amplificó la cadena 3D12.E3-VL-hCk usando los cebadores P16 y P4. Ambas reacciones de PCR se llevaron a cabo de acuerdo a procedimientos y técnicas de PCR estándar. Los dos productos de la PCR se purificaron por gel, y se usaron juntos como templados superpuestos para la subsiguiente reacción de PCR superpuesta usando los cebadores P23 y P4 bajo condiciones de PCR estándar. El producto

final de la PCR, la cadena liviana hIL-1 α / β DVD1-Ig, hIL-1 α / β DVD1-VL-hC κ , se subclonó en el vector de expresión pEF6 TOPO de mamífero (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. En la Tabla 7 se muestran las secuencias de cada uno de los cebadores para PCR usados en este procedimiento.

Tabla 7. Cebadores para PCR

P16: 5' AAT ATC CAG ATG ACA CAG ACT ACA TCC 3'	SEQ ID N°: 115
P26: 5' GTGT CAT CTG GAT ATT CCG TTT TAT TTC CAG CTT TG 3'	SEQ ID N°: 116

Ejemplo 1.3.B. Clonación molecular de DVD2-Ig hIL-1 α / β

La cadena 13F5.G5-VH se amplificó por PCR usando los cebadores P21 y P17. La cadena 3D12.E3-VH-hCy1 se amplificó usando los cebadores P18 y P8. Ambas reacciones de PCR se llevaron a cabo de acuerdo a procedimientos y técnicas de PCR estándar. Los dos productos de la PCR se purificaron por gel, y se usaron juntos como templados superpuestos para la subsiguiente reacción de PCR superpuesta usando los cebadores P21 y P8 bajo condiciones de PCR estándar. El producto final de la PCR, la cadena pesada de DVD2-Ig, hIL-1 α / β DVD2-VH-hCy1, se subclonó en el vector de expresión pcDNA3.1 TOPO de mamífero (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. En la Tabla 8 se muestran las secuencias de cada uno de los cebadores para PCR usados en este procedimiento.

Tabla 8. Cebadores para PCR

P17: 5' TGG GGG TGT CGT TTT GGC TGA GG 3'	SEQ ID N°: 117
P18: 5' GCC AAA ACG ACA CCC CCA CAG ATC CAG TTG GTG CAG 3'	SEQ ID N°: 118

Para generar la cadena liviana hIL-1 α /βDVD2-Ig, se amplificó la cadena 13F5.G5-VL por PCR usando los cebadores P23 y P19. La cadena 3D12.E3-VL-hCκ se amplificó usando los cebadores P20 y P4. Ambas reacciones de PCR se llevaron a cabo de acuerdo a procedimientos y técnicas de PCR estándar. Los dos productos de la PCR se purificaron por gel, y se usaron juntos como templados superpuestos para la subsiguiente reacción de PCR superpuesta usando los cebadores P23 y P4 bajo condiciones de PCR estándar. El producto final de la PCR, la cadena liviana hIL-1 α /βDVD2-Ig, hIL-1 α /βDVD2-VL-hCκ, se subclonó en el vector de expresión pEF6 TOPO de mamífero (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. En la Tabla 9 se muestran las secuencias de cada uno de los cebadores para PCR usados en este procedimiento.

Tabla 9. Cebadores para PCR

P19: 5' TGG TGC AGC ATC AGC CCG TTT TAT TTC 3'	SEQ ID N°: 119
P20: 5' GCT GAT GCT GCA CCA AAT ATC CAG ATG ACA CAG 3'	SEQ ID N°: 120

Las secuencias finales de hIL-1 α /βDVD1-Ig y de hIL-1 α /βDVD2-Ig se describen en la Tabla 10.

Tabla 10. Secuencia de aminoácidos de la proteína de unión hll-1 α / β DVD1-Ig y hll-1 α / β DVD2-Ig

Proteína		Identificador de secuencia	Secuencia
Región proteica			12345678901234567890
VARIABLE PESADA DE DVD-IG, hIL-1α/βDVD1-Ig		SEQ ID N°: 121	QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGKATLTADKSSSTSYMQLSLTSEDSAMYFCVRFPTGNDYYAMDYWGQGTSVTVSSQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFRNYGMNWVKQAPGKDLKRMAWINTYTGESTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNCLKNEDTATYFCARGIYYYGSSYAMDYWGQGTSTVTVSS
VH 13F5.G5		SEQ ID N°: 95	QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGKATLTADKSSSTSYMQLSLTSEDSAMYFCVRFPTGNDYYAMDYWGQGTSVTVSS

	Conector		Ninguno
	3D12.E3 VH	SEQ ID N°: 89	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCK ASGYTFRNYGMNWVKQAPGK DLKRMWINTYTGESTYADDFK GRFAFSLETSASTAYLQINNLLKN EDTATYFCARGIYYYGSSYAMD YWGQGTSTVTVSS
	CH	SEQ ID N°: 122	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLNISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS

			LSPGK
VARIABLE LIVIANA DE DVD-IG hIL-1α/βDVD1- Ig		SEQ ID N°: 123	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISC RASESVDSYGNSYMHWYQQK PGQPPKLLIYLASNLESGVPARF SGSGSRTDFTLTIDPVEADDAA TYYCQQNNEDPFTFGSGTKLEI KRNIQMTQTTSSLSASLGDRVTI SCRASQDISNCLNHWYQQKPDG TVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC QQGKTLPYAFGGGTKLEINRR
13F5.G5 VL		SEQ ID N°: 96	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISC RASESVDSYGNSYMHWYQQK PGQPPKLLIYLASNLESGVPARF SGSGSRTDFTLTIDPVEADDAA TYYCQQNNEDPFTFGSGTKLEI KR
Conector			Ninguno
3D12.E3 VL		SEQ ID N°: 90	NIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC RASQDISNCLNHWYQQKPDGTV KLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSG SGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQ

			QGKTLPYAFGGGTKLEINR
	CL	SEQ ID N°: 124	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
VARIABLE PESADA DE DVD-IG hIL-1α/βDVD2- Ig		SEQ ID N°: 125	QVQLQQSGAELVRPGSSVKISC KASGYAFSSYWMNWVKQRPG QGLEWIGQIYPGDGDTNYNGK FKGKATLTADKSSSTSYMQLSG LTSEDSAMYFCVRFPTGNDYYA MDYWGGGTSVTVSS <u>AKTTTPPQ</u> IQLVQSGPELKKPGETVKISCKA SGYTFRNYGMNWVKQAPGKDL KRMWINTYTGESTYADDFKG RFAFSLETSASTAYLQINNLIKNE DTATYFCARGIYYYGSSYAMDY WGQGTSVTVSS
	13F5.G5 VH	SEQ ID N°: 95	QVQLQQSGAELVRPGSSVKISC KASGYAFSSYWMNWVKQRPG QGLEWIGQIYPGDGDTNYNGK FKGKATLTADKSSSTSYMQLSG

			LTSEDSAMYFCVRFPTGNDYYA MDYWGQGTSVTVSS
	Conector	SEQ ID N°: 75	AKTTPP
	3D12.E3 VH	SEQ ID N°: 89	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCK ASGYTFRNYGMNWVKQAPGK DLKRMAWINTYTGESTYADDFK GRFAFSLETSASTAYLQINNLLKN EDTATYFCARGIYYYGSSYAMD YWGQGTSVTVSS
	CH	SEQ ID N°: 122	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLD

			SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
VARIABLE LIVIANA de DVD-Ig hIL- 1α/βDVD2-Ig		SEQ ID N°: 126	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISC RASESVDSYGNSYMHYQYQQK PGQPPKLLIYLASNLESGVPARF SGSGSRTDFTLTIDPVEADDAA TYYCQQNNEDPFTFGSGTKLEI KR <u>ADAAP</u> NIQMTQTTSSLSASL GDRVITISCRASQDISNCLNWIYQ QKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVP SRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE DIATYFCQQGKTLPYAFGGGK LEINR
13F5.G5 VL		SEQ ID N°: 96	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISC RASESVDSYGNSYMHYQYQQK PGQPPKLLIYLASNLESGVPARF SGSGSRTDFTLTIDPVEADDAA TYYCQQNNEDPFTFGSGTKLEI KR
Conector		SEQ ID N°: 69	ADAAP
3D12.E3 VL		SEQ ID N°: 90	NIQMTQTTSSLSASLGDRVITISC

			RASQDISNCLNWWYQQKPDGTV KLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSG SGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQ QGKTLPYAFGGGKLEINR
	CL	SEQ ID N°: 124	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Ejemplo 1.3.C. Expresión y purificación de la proteína de unión hIL-1 α / β DVD1-Ig

Se subclonaron las cadenas pesada y liviana de cada construcción en los vectores pcDNA3.1 TOPO y pEF6 TOPO (Invitrogen Inc.), respectivamente, y se secuenciaron para asegurar la exactitud. Los plásmidos que codifican las cadenas pesada y liviana de cada construcción se expresaron transitoriamente usando los reactivos Lipofectamine 2000 y 293fectina, respectivamente en células COS así como en células 293 de riñón embrionario humano (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA). Los medios de los cultivos celulares se cosecharon 72 horas después de la transfección transitoria y los anticuerpos se purificaron usando cromatografía con proteína A (Pierce, Rockford, IL) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Los anticuerpos se analizaron usando SDS-PAGE y se cuantificaron por A280 y BCA (Pierce, Rockford, IL). En la Tabla 11 se muestra que los niveles de expresión de hIL-1 α / β DVD1-Ig y hIL-1 α / β DVD2-Ig son

comparables a los de los anticuerpos quiméricos, lo cual indica que la proteína de unión DVD-Ig se puede expresar de manera eficiente en células de mamífero.

Tabla 11. Análisis de la expresión y del peso molecular de la proteína de unión DVD-Ig hIL-1 α/β

	Nivel de expresión (ng/ml)		Masa molecular (Dalton)		
	COS	Freestyle 293	Cadena liviana	Cadena pesada	Longitud completa
Falso	0	0			
3D12.E3- Ch	2788	3886	23,696	49,914	147,220
13F5.G5- Ch	3260	3562	24,084	49,518	147,204
DVD1-Ig	2988	3300	35,797 (35,790)	64,380 (64,371)	200,346 (200,521)
DVD2-Ig	2433	3486	36,222 (36,220)	64,976 (64,973)	202,354 (202,573)

La masa molecular de la cadena liviana, la cadena pesada y la proteína de unión DVD1-Ig y de la proteína de unión DVD2-Ig de longitud completa determinada experimentalmente por espectrometría de masa se muestra entre paréntesis.

Ejemplo 1.4. Espectrometría de masa y análisis SEC de la proteína de

unión DVD-Ig hIL-1 α / β

Para medir el peso molecular (PM) de las pesadas liviana y cadena de la proteína de unión DVD-Ig, se redujeron 10 μ l de la molécula de DVD-Ig (0,8 μ g/ μ l) con una solución de DTT 1,0 M (5 μ l). Se usó una columna para proteínas PLRP-S, de 8 μ m, 4000A y 1 x 150 mm (Michrom BioResource, Auburn, MA) para separar las cadenas pesada y liviana de la molécula de DVD-Ig. Se usó un equipo de HPLC capilar Agilent HP1100 (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA) con el espectrómetro de masa QSTAR (Applied Biosystems, Foster City, CA). La válvula Valco se definió en 10 minutos para cambiar el flujo de desecar a MS para desalar la muestra. La solución amortiguadora A era 0,02% de TFA, 0,08% de FA, 0,1% de ACN y 99,8% de H₂O para HPLC. La solución amortiguadora B contenía 0,02% de TFA, 0,08% de FA, 0,1% de H₂O para HPLC y 99,8% de ACN. La velocidad de flujo de la HPLC era de 50 μ l/minuto y el volumen de inyección de la muestra era de 8,0 μ l. La temperatura del horno de la columna se ajustó en 60°C, y el gradiente de separación era: 5% de B durante 5 minutos; 5% de B a 65% de B durante 35 minutos; 65% de B a 95% de B durante otros 5 minutos y 95% de B a 5% de B durante 5 minutos. El barrido TOFMS era de 800 a 2500 amu, y los ciclos fueron de 3600. Para determinar el PM de la proteína de unión DVD-Ig de longitud completa, se usó un cartucho MicroTrap para proteínas (Michrom BioResource, Auburn, MA) para desalar la muestra. El gradiente de HPLC era: 5% de B durante 5 minutos; 5% de B a 95% de B en 1 minuto; y de 95% B a 5% de B en otros 4 minutos. El barrido QSTAR TOFMS era de 2000 a 3500 amu, y los ciclos eran de 899. Todos los datos crudos de la MS se

analizaron usando el software Analyst QS (Applied Biosystems). Para el análisis por SEC de la proteína de unión DVD-Ig, se aplicaron la proteína de unión DVD-Ig y Abs quiméricos, en PBS, a una columna Superose 6 10/300 G2, de 300 x 10 mm (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ). Para la SEC se usó un instrumento de HPLC, Modelo 10A (Shimadzu, Columbia, MD). Todas las proteínas se determinaron usando detección UV a 280 nm y 214 nm. La elución era isocrática a una velocidad de flujo de 0,5 ml/minuto. Para el estudio de estabilidad, las muestras en el rango de concentración de 0,2-0,4 mg/ml en PBS fueron sometidas a 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento entre -80°C y 25°C, o se incubaron a 4°C, 25°C o 40°C, durante 4 semanas y 8 semanas, seguido por el análisis SEC.

La proteína de unión DVD-Ig y los anticuerpos quiméricos se purificaron por cromatografía con proteína A. El rendimiento de la purificación (3-5 mg/l) era consistente con la cuantificación por hlgG del medio de expresión para cada proteína. La composición y la pureza de las proteínas de unión DVD-Ig y anticuerpos quiméricos purificados se analizaron por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y no reductoras. En la condición no reducida, cada una de las cuatro proteínas migró como una sola banda. Las proteínas DVD-Ig mostraron un mayor peso molecular que los anticuerpos quiméricos, según lo esperado. En la condición no reductora, cada una de las cuatro proteínas mostró dos bandas, una de la cadena pesada y una de la cadena liviana. Nuevamente, las cadenas pesada y liviana de las proteínas de unión DVD-Ig eran de mayor tamaño que las de los anticuerpos quiméricos. El análisis por SDS-PAGE mostró que cada

proteína de unión DVD-Ig se expresa como una sola especie, y las cadenas pesada y liviana se aparean eficazmente para formar una molécula tipo IgG. Los tamaños de las cadenas pesada y liviana, así como la proteína de longitud completa de dos moléculas de DVD-Ig son consistentes con su masa molecular calculada basado en las secuencias de aminoácidos (véase la Tabla 11).

Con el fin de determinar el peso molecular exacto de las proteínas de unión DVD-Ig, se empleó espectrometría de masa. Según se muestra en la Tabla 1, la masa molecular determinada experimentalmente de cada proteína de unión DVD-Ig, incluyendo la cadena liviana, la cadena pesada y la proteína de longitud completa, es acorde con el valor predicho. Para un estudio adicional de las propiedades físicas de la proteína de unión DVD-Ig en solución, se usó cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) para analizar cada proteína. Tanto los quiméricos y la proteína de unión DVD2-Ig mostraron un solo pico, demostrando así su homogeneidad física como proteínas monoméricas. El Ab quimérico 3D12.E3 mostró un menor tamaño físico luego el Ab quimérico 13F5.G5, indicando así que el Ab quimérico 3D12.E3 adoptó una forma globular más compacta. La proteína de unión DVD1-Ig reveló un pico principal así como un pico tipo hombro a la derecha, lo cual sugiere que una porción de la proteína de unión DVD1-Ig posiblemente se encuentra en una forma agregada bajo la condición de solución amortiguadora actual.

Ejemplo 1.5: Análisis de la estabilidad *In vitro* de las proteínas de unión DVD-Ig hIL-1 α / β

La estabilidad física de la DVD-Ig se evaluó de la siguiente manera. Los

anticuerpos purificados en el rango de concentración de 0,2-0,4 mg/ml en PBS fueron sometidos a 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento entre -80°C y 25°C, o se incubaron a 4°C, 25°C o 40°C, durante 4 semanas y 8 semanas, seguido por análisis usando análisis de cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) (véase la Tabla 12).

Tabla 12. Análisis de la estabilidad *in vitro* de hII-1 α / β DVD-Ig por SEC

	3D12.E3-Ch			13F5.G5-Ch			DVD1-Ig			DVD2-Ig		
	Ag r	Ab	Fra g	Ag r	Ab	Fra g	Agr	Ab	Fra g	Agr	Ab	Frag
3x congel amient o- desco ngela miento	1,7 2	98, 28	0,00	13, 0	87, 0	0,0	46, 50	53, 50	0,00	0,0	100 ,0	0,0
4°C @ 4 Sem.	0,8 5	99, 15	0,00	4,2	95, 8	0,0	42, 43	56, 63	0,94	0,0	100 ,0	0,0
25°C @ 4 Sem.	1,2 9	98, 71	0,00	0,0	100 ,0	0,0	45, 66	54, 34	0,00	0,0	100 ,0	0,0

40°C												
@ 4	1,6	98,		20,	78,		36,	59,			100	
Sem.	5	35	0,00	3	1	1,6	70	42	3,88	0,0	,0	0,0
4°C @												
8	5,3	90,			97,		38,	56,			100	
Sem.	5	33	4,32	2,2	8	0,0	18	91	4,91	0,0	,0	0,0
25°C												
@ 8	1,1	60,	38,3		97,		24,	67,			100	
Sem.	1	55	4	1,4	5	1,0	42	39	8,19	0,0	,0	0,0
40°C												
@ 8	4,7	81,	13,7	34,	65,		20,	67,	12,2		100	
Sem.	4	47	9	6	4	0,0	55	16	9	0,0	,0	0,0

El grado de agregación y fragmentación se muestran como un porcentaje, en tanto el porcentaje de Ab representa la molécula intacta.

Agr: Agregados;

Ab: anticuerpo intacto;

Frag.: Fragmentos.

Ambos anticuerpos quiméricos mostraron grados menores de agregación y fragmentación, lo cual es normal para una molécula regular de IgG. La proteína de unión DVD1-Ig mostró algo de agregación en la SEC después de la purificación. En el análisis de estabilidad, la proteína de unión DVD1-Ig también mostró agregaciones en PBS bajo diferentes condiciones; sin embargo el porcentaje de la forma agregada de la proteína de unión DVD1-Ig no aumentó

durante el almacenamiento prolongado o a temperaturas más altas. El porcentaje de la forma fragmentada de la proteína de unión DVD1-Ig se encontraba en el rango normal, similar al del Ab quimérico 3D12.E3. Por el contrario, la proteína de unión DVD2-Ig mostró una estabilidad excepcional. No se detectó agregación o fragmentación para la proteína de unión DVD2-Ig bajo todas las condiciones evaluadas, y el 100% de la proteína de unión DVD2-Ig se mantuvo como una molécula monomérica intacta.

Ejemplo 1.6. Determinación de la afinidad de unión al antígeno de las proteínas de unión DVD-Ig hIL-1 α / β

La cinética de la unión de las moléculas de DVD-Ig a rhIL1- α y rhIL1- β se determinó por medio de mediciones de resonancia de plasmón superficial con un instrumento Biacore 3000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia) usando HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y 0,005% de agente tensioactivo P20) a 25°C. Todos los compuestos químicos se obtuvieron de Biacore AB (Uppsala, Suecia) o de lo contrario de una fuente diferente descrita en la presente. Se inmovilizaron directamente aproximadamente 5000 RU del fragmento IgG Fcy de cabra anti-humana (Fcy), el fragmento específico del anticuerpo policlonal (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL) diluido en acetato de sodio 10 mM (pH 4,5), a través de un chip biosensor CM5 de grado de investigación, usando un conjunto de elementos convencional para la asociación de aminas, de acuerdo con las instrucciones y procedimientos del fabricante a 25 μ g/ml. Las fracciones no reactivas sobre la superficie del biosensor fueron bloqueadas con etanolamina. Como superficie de reacción, se usó una superficie

de carboximetil dextrano modificado en las celdas de flujo 2 y 4. Se usó carboximetil dextrano no modificado sin IgG anti-humana de cabra en las celdas de flujo 1 y 3 como superficie de referencia. Para el análisis cinético, se ajustaron simultáneamente ecuaciones derivadas del modelo de unión de Langmuir 1:1 a las fases de asociación y disociación de las diez inyecciones (usando un análisis de ajuste global) utilizando el software Biaevaluation 4.0.1. Las muestras de DVD-Ig purificadas se diluyeron en solución amortiguadora salina-HEPES para la captura entre las superficies reacción específicas de IgG Fc anti-humano de cabra y se inyectaron sobre las matrices de reacción a una velocidad de flujo de 5 ml/minuto. Las constantes de velocidad de asociación y disociación, k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$) y k_{off} (s^{-1}) se determinaron bajo un velocidad de flujo continuo de 25 μ l/minuto. Las constantes de velocidad se derivaron efectuando mediciones de unión cinética a diez concentraciones de antígeno diferentes que varían en un rango de 1,25-1000 nM. La constante de disociación del equilibrio (M) de la reacción entre la molécula DVD-Ig y rhIL1 $\alpha\beta$ se calculó luego a partir de las constantes cinéticas según la siguiente fórmula: $K_D = k_{off}/k_{on}$. También se inyectaron simultáneamente alícuotas de las muestras de rhIL1 $\alpha\beta$ sobre una referencia blanco y la superficie de reacción CM para registrar y sustraer cualquier ruido de unión no específica para eliminar la mayor parte del cambio por índice de refracción y el ruido debido a la inyección. Las superficies se regeneraron con dos inyecciones subsiguientes de 25 ml de glicina 10 mM (pH 1,5) a una velocidad de flujo de 5 ml/minuto. Las superficies inmovilizadas con anticuerpo anti-Fc se regeneraron por completo y retuvieron su capacidad de captura completa sobre doce ciclos. La

estequiometría aparente del complejo capturado de DVD-Ig- rhIL1 $\alpha\beta$ se calculó bajo condiciones de unión de saturación (equilibrio en estado estable) usando la siguiente fórmula:

$$\text{Estequiometría} = \frac{\text{respuesta rhIL1}\tilde{\alpha}\beta \text{ (RU)}}{\text{respuesta de DVD (RU)}} \times \frac{\text{DVD-Ig (PM)}}{\text{rhIL1}\alpha/\beta \text{ (PM)}}$$

El análisis con Biacore indicó que los anticuerpos quiméricos tenía una cinética de unión y afinidades similares por la IL-1 que los anticuerpos monoclonales del hibridoma original, lo cual indicaba que se habían aislado las secuencias VL/VH correctas (Tabla 13). Los parámetros de unión globales de las dos proteínas de unión DVD-Ig por hIL α eran similares, siendo las afinidades de las proteínas de unión DVD-Ig tan solo 2-3 veces menos que las del anticuerpo quimérico 3D12.E3. La afinidad de unión de la proteína de unión DVD2-Ig por hIL β era ligeramente menor que la del anticuerpo quimérica 13F5.G5, pero 3 veces mayor que la de la proteína de unión DVD1-Ig. La afinidad de las dos proteínas de unión DVD-Ig por hIL-1 en comparación con la afinidad de los anticuerpos quiméricos por hIL-1 era similar como indicaba la evaluación de la estequiometría por IL-1. Ambos anticuerpos quiméricos, siendo monoespecíficos bivalentes, se unían a IL-1 α e IL-1 β en Biacore con una estequiometría de 1,6 y 1,7, respectivamente. Esto es común para una IgG debido a la interferencia intermolecular cuando los anticuerpos se inmovilizan densamente en el chip sensor de Biacore dando como resultado una estequiometría en el rango de 1,5 a 2,0. Las estequiometrías de ambas proteínas de unión DVD-Ig por hIL-1 α y hIL-

1 β eran similares a las de los dos anticuerpos quiméricos, lo cual indicaba que ambas proteínas de unión DVD-Ig tenían una capacidad de unión bivalente a cada antígeno.

Tabla 13. Caracterización funcional de las proteínas de unión a IL-1

Proteína de unión a IL-1	Antígeno	k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_d (M)	Estequiometría	Potencia IC_{50} (M)
3D13.E3	hIL-1 α	6,43 x 10 ⁺⁵	7,13 x 10 ⁻⁴	1,11 x 10 ⁻⁹	2,0	6,70 x 10 ⁻¹⁰
3D12.E3-Ch	hIL-1 α	4,12 x 10 ⁺⁵	5,52 x 10 ⁻⁴	1,34 x 10 ⁻⁹	1,6	7,00 x 10 ⁻¹⁰
DVD1-Ig	hIL-1 α	3,70 x 10 ⁺⁴	1,05 x 10 ⁻⁴	2,83 x 10 ⁻⁹	1,8	2,30 x 10 ⁻⁹
DVD2-Ig	hIL-1 α	7,35 x 10 ⁺⁴	2,52 x 10 ⁻⁴	3,42 x 10 ⁻⁹	2,0	2,90 x 10 ⁻⁹
13F5.G5	hIL-1 β	2,13 x 10 ⁺⁶	6,21 x 10 ⁻⁴	2,91 x 10 ⁻¹⁰	1,8	6,00 x 10 ⁻¹⁰
13F5.G5-Ch	hIL-1 β	1,41 x 10 ⁺⁶	6,54 x 10 ⁻⁴	4,62 x 10 ⁻¹⁰	1,7	5,30 x 10 ⁻¹⁰
DVD1-Ig	hIL-1 β	6,09 x 10 ⁺⁵	1,59 x 10 ⁻³	2,60 x 10 ⁻⁹	1,5	3,10 x 10 ⁻⁹
DVD2-Ig	hIL-1 β	1,19 x 10 ⁺⁵	9,50 x 10 ⁻⁴	7,98 x 10 ⁻¹⁰	1,8	1,60 x 10 ⁻¹⁰

		10^{+6}	10^{-4}			9
--	--	-----------	-----------	--	--	---

La afinidad y la estequiometría se midieron por Biacore; la potencia (IC_{50}) se determinó con el bioensayo MRC-5;

Ch = quimérico

Además, también se analizó la unión al antígeno dual con especificidad tetravalente de la proteína de unión DVD-Ig por Biacore (Tabla 14). La proteína de unión DVD-Ig se capturó primero con un anticuerpo anti-Fc humano de cabra con el chip sensor de Biacore, y el primer antígeno se inyectó y se observó una señal de unión. Como la proteína de unión DVD-Ig era saturada con el primer antígeno, luego se inyectó el segundo antígeno y se observó la segunda señal. Esto se realizó ya sea inyectando primero IL-1 β y luego IL-1 α o inyectando primero IL-1 α seguido por IL-1 β para la proteína de unión DVD2-Ig. En cualquiera de las secuencias, se detectó una actividad de unión dual. Se obtuvieron resultados similares para la proteína de unión DVD1-Ig. Por consiguiente, cada proteína de unión DVD-Ig se pudo unir a ambos antígenos simultáneamente como una molécula tetravalente con especificidad dual. Según se muestra en la Tabla 14, la estequiometría de la proteína de unión DVD-Ig por el primer antígeno, ya sea hIL-1 α o hIL-1 β , era mayor que 1,5, similar a la de la unión bivalente mono-específica. Con la inyección del segundo antígeno, en tanto la proteína de unión DVD-Ig ya estaba ocupada por el primer antígeno, la estequiometría de ambas proteínas de unión DVD-Ig por el segundo antígeno (es decir, hIL-1 α o hIL-1 β) era de entre 1,0 y 1,3. Por consiguiente, la proteína de unión DVD-Ig se pudo unir a las dos moléculas de IL-1 α y a dos moléculas de IL-1 β . La proteína de unión

DVD-Ig se capturó primero con un anticuerpo anti-Fc humano de cabra con el chip sensor de Biacore, y el primer antígeno se inyectó y se observó una señal de unión, seguido por la inyección del segundo antígeno.

Tabla 14. Análisis de la estequiometría de la proteína de unión DVD-Ig hIL-1 α / β en la unión con especificidad dual tetravalente por IL-1 α / β

Unidad de respuesta			Estequiometría	
Proteína de unión capturada	1er antígeno	2º antígeno	hIL-1 α :DVD-Ig	hIL-1 β :DVD-Ig
DVD1-Ig:932	hIL-1 α :190	hIL-1 β :75	2,3	1,0
DVD1-Ig:1092	hIL-1 β :141	hIL-1 α :107	1,1	1,5
DVD2-Ig:1324	hIL-1 α :209	hIL-1 β :137	1,8	1,3
DVD2-Ig:1184	hIL-1 β :159	hIL-1 α :131	1,2	1,6

Ejemplo 1.7. Determinación de la homogeneidad funcional de las moléculas de DVD-Ig

Dado que la proteína de unión DVD2-Ig se purificó por cromatografía con proteína A en lugar de una cromatografía de afinidad específica del blanco, es posible evaluar cualquier potencial dominio VL/VH plegado erróneamente y/o no

coincidente, si estuviera presente, mediante estudios de unión contra los dos antígenos diferentes. Dicho análisis de unión se condujo utilizando cromatografía líquida por exclusión de tamaño (SEC). La proteína de unión DVD2-Ig se aplicó a la columna, sola o después de un período de 120 minutos de incubación a 37°C con IL-1 α , IL-1 β , o ambas IL-1 α e IL-1 β , a una relación molar igual. Cada uno de los antígenos también se corrieron solo como controles. Los resultados de la SEC indicaron que la proteína de unión DVD2-Ig se pudo unir a la IL-1 α y a la IL-1 β en solución, y dicha unión dio como resultado un cambio en la señal SEC indicando un aumento en el tamaño dinámico de la proteína de unión DVD2-Ig cuando se encontraba formando un complejo con cualquier antígeno. El cambio de la señal de la proteína de unión DVD2-Ig era del 100%, no parcial, lo cual sugiere que todas las moléculas DVD2-Ig pudieron unirse al antígeno. En la presencia de ambas IL-1 α e IL-1 β , hubo un cambio adicional y completo de la señal de la proteína de unión DVD2-Ig, lo cual indica que todas las moléculas DVD2-Ig se pudieron unir a ambos antígenos de una manera uniforme. Este experimento demostró que la proteína de unión DVD-Ig se expresaba como una proteína funcionalmente homogénea. Esto tiene implicancias significativas ya que demuestra que la proteína de unión DVD-Ig se puede producir como una especie homogénea individual, funcional, que difiere de todas las moléculas biespecíficas, multi-específicas y multi-valentes tipo inmunoglobulina y derivadas de inmunoglobulina descritas previamente.

Ejemplo 1.8. Determinación de la actividad biológica de las proteínas de unión DVD-Ig

La actividad biológica de DVD-Ig se midió usando un bioensayo MRC-5. La línea celular MRC-5 es una línea celular de fibroblastos de pulmón humano que produce IL-8 como respuesta a la IL-1 α y IL-1 β humanas de una manera dependiente de la dosis. Las células MRC-5 se obtuvieron de ATCC y se cultivaron en 10% de FBS MEM completo a 37°C en un incubador con 5% de CO₂. Para determinar la actividad neutralizante de DVD-Ig contra la IL-1 α o la IL-1 β , se agregaron 50 μ l de anticuerpo (entre 1×10^{-7} y 1×10^{-12} M) en MEM/10% de FBS a una placa de 96 cavidades y se preincubaron con 50 μ l de hIL-1 α o hIL-1 β (200 pg/ml) durante 1 hora a 37°C, 5% de CO₂. Luego se agregaron células MRC-5 a una concentración de 1×10^5 /ml (100 μ l) a todas las cavidades, y las placas se incubaron durante la noche a 37°C en un incubador con 5% de CO₂.

Los sobrenadantes se cosecharon y se midió la producción de IL-8 humana mediante un ELISA estándar (R&D Systems, Minneapolis, MN). La actividad neutralizante de la proteína de unión DVD-Ig se determinó por su capacidad para inhibir la producción de IL-8. Según se muestra en la Tabla 13, ambas proteínas de unión DVD-Ig pudieron neutralizar la hIL-1 α y la hIL-1 β . De manera consistente con la afinidad de unión a la hIL-1 α , las actividades neutralizantes de la proteína de unión DVD1-Ig y de la proteína de unión DVD2-Ig contra hIL-1 α también eran similares, es decir, 3 veces menores que las de los anticuerpos quiméricos (véase, la Tabla 13). De manera consistente con su afinidad de unión por la hIL-1 β , la actividad neutralizante de la proteína de unión DVD2-Ig por hIL-1 β es ligeramente menor que la del Ab quimérico 13F5.G5, pero 3 veces más alta que la de la proteína de unión DVD1-Ig. En general, no hubo

una disminución significativa en las actividades biológicas de las moléculas de DVD-Ig en comparación con los anticuerpos monoclonales originales.

Para determinar si la proteína de unión DVD-Ig podía inhibir la producción de IL-8 en la presencia de ambas IL-1 α e IL-1 β , se agregaron cantidades iguales de hIL-1 α y de hIL-1 β en el mismo sistema de cultivo del ensayo MRC-5. Tanto la proteína de unión DVD1-Ig como la proteína de unión DVD2-Ig pudieron inhibir la síntesis de IL-8 por las células MRC-5 en la presencia de ambas IL-1 α e IL-1 β , con actividades similares a las de los mono-ensayos donde solamente había una citoquina (Tabla 13). En este ensayo donde ambas IL-1 α e IL-1 β estaban presentes, la actividad de inhibición dual de la proteína de unión DVD2-Ig (1,2 nM) eran más alta que la de la proteína de unión DVD1-Ig (2,2 nM).

Ejemplo 2. Análisis del tamaño del conector y de la orientación del dominio variable en las proteínas de unión DVD-Ig

Se construyeron moléculas de DVD-Ig adicionales con diferentes pares de mAb parentales, según se muestra en la Tabla 15. Por cada par de mAbs, se generaron cuatro construcciones diferentes de DVD-Ig : 2 con un conector corto y 2 con un conector largo, cada uno en dos orientaciones de dominio diferentes: a-b-C (dominio constante alfa-beta) y b-a-C (dominio constante beta-alfa). Las secuencias del conector, se derivaron de la secuencia N-terminal del dominio Ck o CH1 humano, de la siguiente manera: Conector corto: cadena liviana: TVAAP (SEQ ID N°: 71); cadena pesada: ASTKGP (SEQ ID N°: 79); y conector largo: cadena liviana: TVAAPSVFIFPP (SEQ ID N°: 72); cadena pesada: ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID N°: 80).

Todas las construcciones de cadenas pesada y liviana se subclonaron en el vector de expresión pBOS, y se expresaron en células COS o células freestyle 293.

Para construir nuevos clones de DVD-Ig, los dominios variables de los dos mAbs, tanto la cadena liviana como la cadena pesada, se unieron primero en tándem usando PCR superpuesto como se describió para la hIL-1 α /βDVD1-Ig y la hIL-1 α /βDVD2-Ig. Las piezas unidas se subclonaron luego en el vector pBOS usando recombinación homóloga. Brevemente, los vectores se linealizaron mediante digestión por restricción (2 μ g del vector pBOS-hCk se digirieron con FspAI y BsiWI en una solución amortiguadora O+ y 2 μ g del vector pBOS-hC γ z, no a se digirió con FspAI y Sall en solución amortiguadora O+). Las muestras digeridas se corrieron sobre un gel de agarosa 1% y el fragmento de esqueleto se purificó en 50 μ l de agua. Para la recombinación homóloga y la transformación, se descongelaron células DH5 α competentes sobre hielo y luego se mezclaron con 20-50 ng de producto de PCR reunido y 20-50 ng de vector linealizado (por cada 50 μ l de células DH5 α). La mezcla se mezcló suavemente y se incubó sobre hielo por 45 minutos, seguido por shock de calor a 42°C durante 1 minuto. Luego se agregaron 100 μ l de medio SOC y se incubaron a 37°C durante 1 hora. El cultivo de transformación se inoculó sobre placas de LB/agar que contienen ampicilina y se incubó a 37°C durante 18-20 horas. Se aislaron los clones bacterianos, a partir de los cuales se purificó ADN y fueron sometidos a un análisis de secuenciación. Los clones finales de secuencia verificada se co-transfectaron (haciendo coincidir HV y LC del mismo par de anticuerpos) en células COS o 293 para la expresión y

purificación del anticuerpo, como se describió previamente.

Las características de las proteínas DVD-Ig purificadas se resumen en la Tabla 16. En la sección izquierda de la Tabla 16 se muestra la especificidad, la afinidad de unión y la potencia de neutralización de los 2 pares de mAbs usados para la construcción de las nuevas moléculas de hIL-1 α / β DVD-Ig. Se usaron los anticuerpos 18F4,2C8 y 1B12,4H4 (véase, el Ejemplo 1.1.D) para construir hIL-1 α / β DVD3a-Ig, hIL-1 α / β DVD4a-Ig, hIL-1 α / β DVD3b-Ig y hIL-1 α / β DVD4b-Ig. hIL-1 α / β DVD3a-Ig y hIL-1 α / β DVD4a-Ig se encontraban en la orientación a-b-C, con un conector corto y largo, respectivamente. hIL-1 α / β DVD3b-Ig y hIL-1 α / β DVD4b-Ig se encontraban en la orientación b-a-C, con un conector corto y largo, respectivamente. Los anticuerpos 6H3.1A4 y 6B12.4F6 se usaron para construir hIL-1 α / β DVD5a-Ig, hIL-1 α / β DVD6a-Ig, hIL-1 α / β DVD5b-Ig y hIL-1 α / β DVD6b-Ig. hIL-1 α / β DVD5a-Ig y hIL-1 α / β DVD6a-Ig se encontraban en la orientación a-b-C, con un conector corto y largo, respectivamente. hIL-1 α / β DVD5b-Ig y hIL-1 α / β DVD6b-Ig se encontraban en la orientación b-a-C, con un conector corto y largo, respectivamente. La clonación molecular de estas proteínas de unión DVD-Ig hIL-1 α / β adicionales se efectuó usando el procedimiento descrito previamente para hIL-1 α / β DVD1-Ig (véase, Ejemplo 1.3), usando procedimientos de PCR superpuestos. Las secuencias de aminoácidos de estas proteínas de unión DVD-Ig hIL-1 α / β adicional se divulgan en la Tabla 15.

Tabla 15. Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y de la cadena liviana de seis proteínas DVD-Ig capaces de unirse a la IL-1 α y a la IL-1 β

Proteína		Identificador de	Secuencia
	Región proteica	secuencia	12345678901234567890
VARIABLE PESADA de DVD-Ig hIL-1α/β DVD3a-Ig		SEQ ID N°: 127	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTA SGLNIKDTYMHWLKQRPEQGLEWI GRIDPANGNAKYDPRFLGKATITAD TSSNTAYLQLSSLTSEDTAIVYYCAR GDGNFHF ~~FDYWGQG~~ TTLTVSS ~~AST~~ ~~KGP~~ QVHLKESGPGLVAPSQSLSIT CTVSGFSLTDYGVSWIRQPPGKGL EWLGLIWGGGDTYYNSPLKSRLSI RKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAVY YCAKQRTLWGYDLYGMDYWGQG TSVTVSS
	<u>18F4.2C8 VH</u>	SEQ ID N°: 91	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTA SGLNIKDTYMHWLKQRPEQGLEWI GRIDPANGNAKYDPRFLGKATITAD TSSNTAYLQLSSLTSEDTAIVYYCAR GDGNFHF ~~FDYWGQG~~ TTLTVSS
	CONECTOR	SEQ ID N°: 79	ASTKGP
	1B12.4H4 VH	SEQ ID N°: 97	QVHLKESGPGLVAPSQSLSITCTVS GFSLTDYGVSWIRQPPGKGLEWL GLIWGGGDTYYNSPLKSRLSIRKD

			NSKSQVFLKMNSLQTDDTAVYYCA KQRTLWGYDLYGMDYWGQGTSTV TVSS
	CH	SEQ ID N°: 122	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
VARIABLE LIVIANA DE DVD-IG HIL-1 α/β DVD3a-Ig		SEQ ID N°: 128	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVSVTCK ASQNVGTNIAWYQQKPGQSPRALI YSASYRYSQVPDRFTGSGSGTDFT LTISNVQSVDLAEYFCQQYTRYPLT FGGGTKLEIKRTVAAPETTVTQSPA

			SLSMAIGEKVITIRCITSTDIDVDMN WYQQKPGEPKLLISQGNLTPGV PSRFSSSGSGTDFVFIENMLSEDV ADYYCLQSDNLPLTFGAGTKLELK RR
	<u>18F4.2C8 VL</u>	SEQ ID N°: 92	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVSVTCK ASQNVGTNIAWYQQKPGQSPRALI YSASYRYSVGPDRFTGSGSGTDF LTISNVQSVDLAEYFCQQYTRYPLT FGGGTKLEIKR
	CONECTOR	SEQ ID N°: 71	TVAAP
	1B12.4H4 VL	SEQ ID N°: 98	ETTVTQSPASLSMAIGEKVITIRCITS TDIDVDMNWWYQQKPGEPKLLISQ GNTLRPGVPSRFSSSGSGTDFVFI ENMLSEDVADYYCLQSDNLPLTFG AGTKLELKR
	CL	SEQ ID N°: 124	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPPREKVKQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

VARIABLE PESADA de DVD-Ig hIL-1α/β DVD3b- Ig		SEQ ID N°: 129	QVHLKESGPGLVAPSQSLSITCTVS GFSLTDYGVSWIRQPPGKGLEWL GLIWGGGDTYYNSPLKSRLSIRKD NSKSQVFLKMNSLQTDDTAVYYCA KQRTLWGYDLYGMDYWGGGTSV TVSS <u>ASTKGPEVQLQQSGAELVKP</u> GASVKLSCTASGLNIKDTYMHWLK QRPEQGLEWIGRIDPANGNAKYDP RFLGKATITADTSSNTAYLQLSSLT SEDTAVYYCARGDGNFHF ~~FDY~~ WGQ GTTTLTVSS
	<u>1B12.4H4 VH</u>	SEQ ID N°: 97	QVHLKESGPGLVAPSQSLSITCTVS GFSLTDYGVSWIRQPPGKGLEWL GLIWGGGDTYYNSPLKSRLSIRKD NSKSQVFLKMNSLQTDDTAVYYCA KQRTLWGYDLYGMDYWGGGTSV TVSS
	CONECTOR	SEQ ID N°: 79	ASTKGP
	18F4.2C8 VH	SEQ ID N°: 91	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTA SGLNIKDTYMHWLKQRPEQGLEWI GRIDPANGNAKYDPRFLGKATITAD TSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCAR

			GDGNFHF ~~DY~~ WGQGTTLT ~~V~~ SS
	CH	SEQ ID N°: 122	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVT ~~V~~ SWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDS ~~D~~ GSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
VARIABLE LIVIANA DE DVD-IG HIL-1α/β DVD3b-Ig		SEQ ID N°: 130	ETTVTQSPASLSMAIGKVTIRCITS TDIDVDMN ~~WY~~ QQKPGEPKLLISQ GNTLRPGVPSRFSSSGSGTDFVFII ENMLSEDVADYYCLQSDNLPLTFG AGTKLELKRT <u>VAA</u> PDIVMTQSQRF MSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNIA WYQQKPGQSPRALIYSASYRYS ~~G~~ V

			PDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSVDL AEYFCQQYTRYPLTFGGGKLEIK R
	<u>1B12.4H4 VL</u>	SEQ ID N°: 98	ETTVTQSPASLSMAIGKVTIRCITS TDIDVDMNWWYQQKPGEPKLLISQ GNTLRPGVPSRFSSSGSGTDFVFII ENMLSEDVADYYCLQSDNLPLTFG AGTKLELKR
	CONECTOR	SEQ ID N°: 71	TVAAP
	18F4.2C8 VL	SEQ ID N°: 92	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVSVTCK ASQNVGTNIAWYQQKPGQSPRALI YSASYRYSQVGPDRFTGSGSGTDFT LTISNVQSVDLAEYFCQQYTRYPLT FGGGTKLEIKR
	CL	SEQ ID N°: 124	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPRQAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKSTYSLSSLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
VARIABLE PESADA de DVD-Ig hIL-1α/β		SEQ ID N°: 131	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTA SGLNIKDTYMHWLKQRPEQGLEWI GRIDPANGNAKYDPRFLGKATITAD

DVD4a-Ig			TSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCAR GDGNFHF DYWGQGTTLT VSS <u>AST</u> <u>KGPSVFPLAP</u> QVHLKESGPGLVAP SQSL SITCTVSGFSLTDYGVSWIRQ PPGKGLEWLGLIWGGGDTYYNSP LKSRLSIRKDNSKSKVFLKMNSLQT DDTAVYYCAKQRTLWGYDLYGMD YWGQGTSVTVSS
	<u>18F4.2C8 VH</u>	SEQ ID N°: 91	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTA SGLNIKDTYMHWLKQRPEQGLEWI GRIDPANGNAKYDPRFLGKATITAD TSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCAR GDGNFHF DYWGQGTTLT VSS
	CONECTOR	SEQ ID N°: 80	<u>ASTKGPSVFPLAP</u>
	1B12.4H4 VH	SEQ ID N°: 97	QVHLKESGPGLVAPSQSL SITCTVS GFSLTDYGVSWIRQPPGKGLEWL GLIWGGGDTYYNSPLKSRLSIRKD NSKSKVFLKMNSLQTDDTAVYYCA KQRTLWGYDLYGMDYWGQGTSV TVSS
	CH	SEQ ID N°: 122	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS

			GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKV KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
VARIABLE LIVIANA DE DVD-IG HIL-1α/β DVD4a-Ig		SEQ ID N°: 132	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVSVTCK ASQNVGTNIAWYQQKPGQSPRALI YSASYRYSQVDRFTGSGSGTDFT LTISNVQSVDLAEYFCQQYTRYPLT FGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPETT VTQSPASLSMAIGEKVTIRCITSTDI DVDMNWKYQQKPGEPKLLISQGN TLRPGVPSRFSSSGSGTDFVFIEN MLSEDVADYYCLQSDNLPLTFGAG TKLELKR

	<u>18F4.2C8 VL</u>	SEQ ID N°: 92	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVSVTCK ASQNVGTNIAWYQQKPGQSPRALI YSASYRYSQVPDRFTGSGSGTDFT LTISNVQSVDLAEYFCQQYTRYPLT FGGGTKLEIKR
	CONECTOR	SEQ ID N°: 72	<u>TVAAPSVFIFPP</u>
	1B12.4H4 VL	SEQ ID N°: 98	ETTVTQSPASLSMAIGEKVTIRCITS TDIDVDMNWWYQQKPGEPKLLISQ GNTLRPGVPSRFSSSGSGTDFVFII ENMLSEDVADYYCLQSDNLPLTFG AGTKLELKR
	CL	SEQ ID N°: 124	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
VARIABLE PESADA de DVD-Ig hIL-1α/β DVD4b-Ig		SEQ ID N°: 133	QVHLKESGPGLVAPSQSLSITCTVS GFSLTDYGVSWIRQPPGKGLEWL GLIWGGGDTYYNSPLKSRLSIRKD NSKSQVFLKMNSLQTDDTAVYYCA KQRTLWGYDLYGMDYWGQGTSTV TVSS <u>ASTKGPSVFPLAPEVQLQQS</u>

			GAELVKPGASVKLSCTASGLNIKDT YMHWLKQRPEQGLEWIGRIDPAN GNAKYDPRFLGKATITADTSSNTAY LQLSSLTSEDNAVYYCARGDGNFH FDYWGGGTTTLTVSS
	<u>1B12.4H4 VH</u>	SEQ ID N°: 97	QVHLKESGPGLVAPSQSLSITCTVS GFSLTDYGVSWIRQPPGKGLEWL GLIWGGGDTYYNSPLKSRLSIRKD NSKSQVFLKMNSLQTDDTAVYYCA KQRTLWGYDLYGMDYWGGGTSV TVSS
	CONECTOR	SEQ ID N°: 80	<u>ASTKGPSVFPLAP</u>
	18F4.2C8 VH	SEQ ID N°: 91	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTA SGLNIKDTYMHWLKQRPEQGLEWI GRIDPANGNAKYDPRFLGKATITAD TSSNTAYLQLSSLTSEDNAVYYCAR GDGNFHFDDYWGGGTTTLTVSS
	CH	SEQ ID N°: 122	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG

			PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
VARIABLE LIVIANA DE DVD-IG HIL-1α/β DVD4b-Ig		SEQ ID N°: 134	ETTVTQSPASLSMAIGKVTIRCITS TDIDVDMNWAYQQKPGEPKLLISQ GNTLRPGVPSRFSSSGSGTDFVFII ENMLSEDVADYYCLQSDNLPLTFG AGTKLELKRT <u>V</u> AAPSVFIFPPDIVMT QSQRFMSTSVGDRVSVTCKASQN VGTNIAWYQQKPGQSPRALIYSAS YRYSGVPDRFTGSGSGTDFLTIS NVQSVDLAEYFCQQYTRYPLTFGG GTKLEIKR
<u>1B12.4H4 VL</u>		SEQ ID N°: 98	ETTVTQSPASLSMAIGKVTIRCITS TDIDVDMNWAYQQKPGEPKLLISQ GNTLRPGVPSRFSSSGSGTDFVFII

			ENMLSEDVADYYCLQSDNLPLTFG AGTKLELKR
	CONECTOR	SEQ ID N°: 72	<u>TVAAPSVFIFPP</u>
	18F4.2C8 VL	SEQ ID N°: 92	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVSVTCK ASQNVGTNIAWYQQKPGQSPRALI YSASYRYSQVPDRFTGSGSGTDFT LTISNVQSVDLAEYFCQQYTRYPLT FGGGTKLEIKR
	CL	SEQ ID N°: 124	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
VARIABLE PESADA de DVD-Ig hIL-1α/β DVD5a-Ig		SEQ ID N°: 135	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKA SGYTFTTYWMNWVKQRPEQGLE WIGRIDPYDSETLYSQKFKDTAILT VDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYY CARYGFDYWGQGTTTLTVSS <u>ASTK</u> <u>GPEVQLQQSGPELVKTGTSVKISC</u> KASGYSFTGYMHWRQSHGKSL EWIGYISCYNGFTSYNPKFKGKATF TVDTSSSTAYIQFSRLTSEDSAVYY

			CARSDYYGTNDYWGQGTTTLTVSS
	6H3.1A4.3E11 VH	SEQ ID N°: 93	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKA SGYTFTTYWMNWVKQRPEQGLE WIGRIDPYDSETLYSQKFKDTAILT VDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYY CARYGFDYWGQGTTTLTVSS
	CONECTOR	SEQ ID N°: 79	ASTKGP
	6B12.4F6 VH	SEQ ID N°: 99	EVQLQQSGPELVKTGTSVKISCKA SGYSFTGYMHWVRQSHGKSLE WIGYISCYNGFTSYNPKFKGKATFT VDTSSSTAYIQFSRLTSEDSAVYYC ARSDYYGTNDYWGQGTTTLTVSS
	CH	SEQ ID N°: 122	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE

			MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
VARIABLE LIVIANA DE DVD-IG HIL-1α/β DVD5a-Ig		SEQ ID N°: 136	QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCS ASSSVNYMYWYQQKPRSSPKPWI YLTSNLASGVPARFSGSGSGTSYS LTISSMEAEDAATYYCQQWNSNPY TFGGGTKLEMKRT <u>TVAAP</u> QIVLTQS PAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYM HWFQQKPGASPKLWIYSTSNLASG VPARFSGSGSGTSYSSTVSRMEAE DAATYYCQQRSTYPYTFGGGTKLE IKR
6H3.1A4.3E11 VL		SEQ ID N°: 94	QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCS ASSSVNYMYWYQQKPRSSPKPWI YLTSNLASGVPARFSGSGSGTSYS LTISSMEAEDAATYYCQQWNSNPY TFGGGTKLEMKR
CONECTOR		SEQ ID N°: 71	<u>TVAAP</u>
6B12.4F6 VL		SEQ ID N°: 100	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSAS SSVSYPMHWFQQKPGASPKLWIYS

			TSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLT VSRMEAEDAATYYCQQRSTYPYTF GGGTKLEIKR
	CL	SEQ ID N°: 124	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
VARIABLE PESADA de DVD-Ig hIL-1α/β DVD5b-Ig		SEQ ID N°: 137	EVQLQQSGPELVKTGTSVKISCKA SGYSFTGYMHVVRQSHGKSLE WIGYISCYNGFTSYNPKFKGKATFT VDTSSSTAYIQFSRLTSEDSAVYYC ARSDYYGTNDYWGGTTTLTVSSA <u>STKGPQVQLQQPGAELVRPGASV</u> KLSCKASGYTFTTYWMNWVKQRP EQGLEWIGRIDPYDSETLYSQKFK DTAILTVDKSSSTAYMQLSSLTSED SAVYYCARYGFDYWGGTTTLTVS S
	<u>6B12.4F6 VH</u>	SEQ ID N°: 99	EVQLQQSGPELVKTGTSVKISCKA SGYSFTGYMHVVRQSHGKSLE WIGYISCYNGFTSYNPKFKGKATFT

			VDTSSSTAYIQFSRLTSEDSAVYYC ARSDYYGTNDYWGQGTTTLTVSS
	CONECTOR	SEQ ID N°: 79	<u>ASTKGP</u>
	6H3.1A4.3E11 VH	SEQ ID N°: 93	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKA SGYTFTTYWMNWVKQRPEQGLE WIGRIDPYDSETLYSQKFKDTAILT VDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYY CARYGFDYWGQGTTTLTVSS
	CH	<u>SEQ ID N°: 122</u>	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK

VARIABLE LIVIANA DE DVD-IG HIL-1α/β DVD5b-Ig		SEQ ID N°: 138	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSAS SSVSYMHWFQQKPGASPKLWIYS TSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLT VSRMEAEDAATYYCQQRSTYPYTF GGGTKLEIKRT <u>TVAAP</u> QIVLTQSPAL MSASPGEKVTMTCSASSSVNYMY WYQQKPRSSPKPWIYLTSNLASGV PARFSGSGSGTSYSLTISSMEAED AATYYCQQWNSNPYTFGGGTKLE MKR
	<u>6B12.4F6 VL</u>	SEQ ID N°: 100	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSAS SSVSYMHWFQQKPGASPKLWIYS TSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLT VSRMEAEDAATYYCQQRSTYPYTF GGGTKLEIKR
	CONECTOR	SEQ ID N°: 71	<u>TVAAP</u>
	6H3.1A4.3E11 VL	SEQ ID N°: 94	QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCS ASSSVNYMYWYQQKPRSSPKPWI YLTSNLASGVPARFSGSGSGTSYS LTISSMEAEDAATYYCQQWNSNPY TFGGGTKLEMKR
	CL	SEQ ID N°: 124	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV

			CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
VARIABLE PESADA de DVD-Ig hIL-1α/β DVD6a-Ig		SEQ ID N°: 139	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKA SGYTFTTYWMNWVKQRPEQGLE WIGRIDPYDSETLYSQKFKDTAILT VDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYY CARYGFDYWGQGTTTLTVSS <u>ASTK</u> <u>GPSVFPLAPE</u> VQLQQSGPELVKTG TSVKISCKASGYSFTGYMHWRQ SHGKSLEWIGYISCYNGFTSYNPKF KGKATFTVDTSSSTAYIQFSRLTSE DSAVYYCARSDYYGTNDYWGQGT TLTVSS
6H3.1A4.3E11 VH		SEQ ID N°: 93	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKA SGYTFTTYWMNWVKQRPEQGLE WIGRIDPYDSETLYSQKFKDTAILT VDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYY CARYGFDYWGQGTTTLTVSS
CONECTOR		SEQ ID N°: 80	<u>ASTKGPSVFPLAP</u>
6B12.4F6 VH		SEQ ID N°: 99	EVQLQQSGPELVKTGTSVKISCKA

			SGYSFTGYMHWWVRQSHGKSLE WIGYISCYNGFTSYNPKFKGKATFT VDTSSSTAYIQFSRLTSEDSAVYYC ARSDYYGTNDYWGGGTTTLTVSS
	CH	SEQ ID N°: 122	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
VARIABLE LIVIANA DE DVD-IG HIL-1 α / β DVD 6a-Ig		SEQ ID N°: 140	QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCS ASSSVNYMYWYQQKPRSSPKPWI YLTSNLASGVPARFSGSGSGTSYS LTISSMEAEDAATYYCQQWNSNPY

			TFGGGTKLEMKR <u>TVAAPSVFIFPP</u> QIVLTQSPA ~~I~~ MSASPGEKVTITCSAS SSVS ~~I~~ YMHWFQQKPGASPKLWIYS TSN ~~L~~ ASGV ~~P~~ ARFSGSGSGTSYS ~~L~~ T VSR ~~M~~ E ~~A~~ ED ~~A~~ ATYYCQQRSTYPYTF GGGTKLEIKRR
	6H3.1A4.3E11 VL	SEQ ID N°: 94	QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCS ASSSVNYMYWYQQKPRSSPKPWI YLTSN ~~L~~ ASGV ~~P~~ ARFSGSGSGTSYS LTIS ~~S~~ ME ~~A~~ ED ~~A~~ ATYYCQQWNSNPY TFGGGTKLEMKR
	CONECTOR	SEQ ID N°: 72	<u>TVAAPSVFIFPP</u>
	6B12.4F6 VL	SEQ ID N°: 100	QIVLTQSPA ~~I~~ MSASPGEKVTITCSAS SSVS ~~I~~ YMHWFQQKPGASPKLWIYS TSN ~~L~~ ASGV ~~P~~ ARFSGSGSGTSYS ~~L~~ T VSR ~~M~~ E ~~A~~ ED ~~A~~ ATYYCQQRSTYPYTF GGGTKLEIKR
	CL	SEQ ID N°: 124	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLN ~~N~~ FYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSLT LSKADY ~~E~~ KHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

VARIABLE		SEQ ID N°: 141	EVQLQQSGPELVKTGTSVKISCKA
PESADA de			SGYSFTGYMHWVRQSHGKSLE
DVD-Ig hIL-1α/β			WIGYISCYNGFTSYNPKFKGKATFT
DVD6b-Ig			VDTSSSTAYIQFSRLTSEDSAVYYC
			ARSDYYGTNDYWGQGTTTLTVSSA
			<u>STKGPSVFPLAPQVQLQQPGAELV</u>
			RPGASVKLSCKASGYTFTTYWMN
			WVKQRPEQGLEWIGRIDPYDSETL
			YSQKFKDTAILTVDKSSSTAYMQLS
			SLTSEDSAVYYCARYGFDYWGQG
			TTLTVSS
	<u>6B12.4F6 VH</u>	SEQ ID N°: 99	EVQLQQSGPELVKTGTSVKISCKA
			SGYSFTGYMHWVRQSHGKSLE
			WIGYISCYNGFTSYNPKFKGKATFT
			VDTSSSTAYIQFSRLTSEDSAVYYC
			ARSDYYGTNDYWGQGTTTLTVSS
	CONECTOR	SEQ ID N°: 80	<u>ASTKGPSVFPLAP</u>
	6H3.1A4.3E11	SEQ ID N°: 93	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKA
	VH		SGYTFTTYWMNWVKQRPEQGLE
			WIGRIDPYDSETLYSQKFKDTAILT
			VDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYY
			CARYGFDYWGQGTTTLTVSS

	CH	SEQ ID N°: 122	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
VARIABLE LIVIANA DE DVD-IG HIL-1α/β DVD6b-Ig		SEQ ID N°: 142	QIVLTQSPA ~~IMS~~ ASPGEKVTITCSAS SSVS ~~Y~~ MHW ~~F~~ QQKPGASPKLWIYS TSN ~~L~~ ASGV ~~P~~ ARFSGSGSGTSYS ~~L~~ T VSR ~~M~~ E ~~A~~ ED ~~A~~ ATYYCQQRSTYPYTF GGG ~~T~~ KLEIKRTVA ~~A~~ PSVFIFPPQIVL TQSPALMSASPGEKVTMTCSASSS VNYMYWYQQKPRSSPKPWIYLT NLASGV ~~P~~ ARFSGSGSGTSYS ~~L~~ TISS

			MEAEDAATYYCQQWNSNPYTFGG GTKLEMKRR
	<u>6B12.4F6 VL</u>	SEQ ID N°: 100	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSAS SSVSYMHWFQQKPGASPKLWIYS TSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLT VSRMEAEDAATYYCQQRSTYPYTF GGGTKLEIKR
	CONECTOR	SEQ ID N°: 72	<u>TVAAPSVFIFPP</u>
	6H3.1A4.3E11 VL	SEQ ID N°: 94	QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCS ASSSVNYMYWYQQKPRSSPKPWI YLTSNLASGVPARFSGSGSGTSYS LTISSMEAEDAATYYCQQWNSNPY TFGGGTKLEMKR
	CL	SEQ ID N°: 124	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

Las características de las nuevas construcciones de DVD-Ig se resumen en la Tabla 16. La afinidad (K_d) y la actividad biológica (IC_{50}) se determinaron en un bioensayo con Biacore y MRC-5, respectivamente. El análisis por SDS-PAGE de todas las proteínas DVD-Ig nuevas mostraron patrones de migración normales bajo condiciones reductoras y no reductoras, de manera similar a un anticuerpo

regular y DVD1/2-Ig.

Table 16: Caracterización de nuevas moléculas DVD-Ig derivadas de nuevos pares de mAb

							Afinidad (K _d) M		Potencia (IC ₅₀) M	
mAb	Espec if.	K _d (M)	IC ₅₀ (M)	DVD	Orie nt.	Con ector	IL- 1α	IL- 1β	IL- 1α	IL- 1β
				DVD3 a	a-b-C	corto	8,37 ×10 ⁻¹⁰	6,37 ×10 ⁻⁸	7,50 ×10 ⁻¹⁰	ND
18F4.2 C8	rhIL- 1α	5,95 ×10 ⁻¹⁰	3,30 ×10 ⁻¹⁰	DVD4 a	a-b-C	largo	7,01 ×10 ⁻¹⁰	9,30 ×10 ⁻¹⁰	3,50 ×10 ⁻¹⁰	1,00 ×10 ⁻⁸
1B12.4 H4	rhIL- 1β	2,61 ×10 ⁻¹⁰	6,00 ×10 ⁻¹⁰	DVD3 b	b-a-C	corto	1,24 ×10 ⁻⁹	1,90 ×10 ⁻¹⁰	7,00 ×10 ⁻¹⁰	4,00 ×10 ⁻¹⁰
				DVD4 b	b-a-C	largo	5,60 ×10 ⁻¹⁰	1,28 ×10 ⁻¹⁰	3,50 ×10 ⁻¹⁰	5,00 ×10 ⁻¹⁰
				DVD5 a	a-b-C	corto	5,08 ×10 ⁻¹⁰	1,25 ×10 ⁻¹⁰	2,60 ×10 ⁻¹⁰	1,90 ×10 ⁻¹⁰

6H3.1A 4	rhIL- 1 α	3,54 $\times 10^{-10}$	2,40 $\times 10^{-10}$	DVD6 a	a-b-C	largo	¹⁰ 1,06 $\times 10^{-9}$	⁸ 2,09 $\times 10^{-9}$	⁹ 2,30 $\times 10^{-9}$	⁸ 7,00 $\times 10^{-8}$
6B12.4 F6	rhIL- 1 β	5,54 $\times 10^{-10}$	4,00 $\times 10^{-10}$	DVD5 b	b-a-C	corto	1,32 $\times 10^{-8}$	6,71 $\times 10^{-10}$	3,30 $\times 10^{-9}$	2,50 $\times 10^{-10}$
				DVD6 b	b-a-C	largo	8,20 $\times 10^{-10}$	6,97 $\times 10^{-10}$	1,00 $\times 10^{-9}$	7,50 $\times 10^{-10}$

mAb = anticuerpo monoclonal; NA = no se detectó actividad de neutralización.

La caracterización funcional de las nuevas moléculas de DVD-Ig reveló que con cualquier orientación, las moléculas de DVD-Ig con el conector largo mostraron un mejor desempeño que aquellas con un conector corto en términos de unión y neutralización de ambos antígenos. Con respecto a las moléculas de DVD-Ig con los conectores largos, aquellos con la orientación b-a-C mostraron una buena unión y neutralización de ambos antígenos, en tanto las moléculas de DVD-Ig con una orientación de a-b-C mostraron una buena unión y neutralización de la IL-1 α y redujeron la unión y la neutralización de IL-1 β (por ejemplo, DVD4b versus DVD4a). La molécula de DVD-Ig, DVD4b, se unía y neutralizaba ambas IL-1 α e IL-1 β con sub-nM y retuvo por completo las características de unión y de neutralización de los mAbs parentales.

Ejemplo 3. Generación de moléculas de DVD-Ig mL-1 α / β

Para estudiar los temas clave relativos a la farmacocinética, la eficacia in vivo, la penetración en tejidos y la inmunogenicidad de las moléculas de DVD-Ig, se construyeron moléculas de DVD-Ig anti-ratón IL-1 α β de ratón como se describe a continuación.

Ejemplo 3.1. Construcción de moléculas de DVD-Ig mL-1 α / β

Se construyeron moléculas de DVD-Ig anti-IL-1 α β de ratón de ratón usando dos ratón anticuerpos monoclonales anti-IL-1 α β de ratón (9H10 y 10G11) generados a partir de ratones KO dobles para IL-1 α β . Se generaron anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-IL-1 α de ratón de ratón y anti-IL-1 β de ratón de ratón por inmunización de ratones KO dobles para IL-1 α β con la IL-1 α de ratón o la IL-1 β de ratón, respectivamente. Se seleccionó un mAb anti-IL-1 α de ratón de ratón (clon 9H10) y un anti-IL-1 β de ratón de ratón (clon 10G11), y se usaron para generar moléculas de DVD-Ig mL-1 α β . Se evaluaron diversos tamaños de conectores y diferentes orientaciones de dominio. La molécula de DVD-Ig mL-1 α β funcional final se construyó en la orientación de V(anti-mL-1 β)-conector-V(anti-mL-1 α)-región constante de murinos (Cy2a y Ck). Los procedimientos de clonación, expresión y purificación eran similares a los de la proteína de unión DVD-Ig hIL-1 α β . La clonación de la proteína de unión DVD-Ig mL-1 α β se llevó a cabo usando una PCR de superposición similar y recombinación homóloga como se describió para DVD3-Ig hIL-1 α β . Las secuencias de las proteínas de unión DVD-Ig mL-1 α β se muestran a continuación en la Tabla 17.

Tabla 17. Secuencia de aminoácidos de la proteína de unión DVD-Ig mL-1 α / β

Proteína		Identificador de	Secuencia
	Región proteica	secuencia	12345678901234567890
VARIABLE PESADA de mL- 1α/β DVD-Ig		SEQ ID N°: 143	EVQLQQSGPELVKPGTSVKMSC KTSGYTFTSYVMHWVKQKPGQ GLEWIGYIIPYNDNTKYNEKFKG KATLTSDKSSSTAYMELSSLTSE DSAVYYCARRNEYYGSSFFDYW GQGTTTLTVSS <u>AKTTAPSVYPLAP</u> QVILKESGPGILQPSQTLTLTCSF SGFSLSTYGTAVNWIRQPSGKG LEWLAQIGSDDRKLYNPFLKSRI TLSEDTSNSQVFLKITSVDTEDS ATYYCANGVMEYWGLGTSVTV SS
	10G11 VH	SEQ ID N°: 144	EVQLQQSGPELVKPGTSVKMSC KTSGYTFTSYVMHWVKQKPGQ GLEWIGYIIPYNDNTKYNEKFKG KATLTSDKSSSTAYMELSSLTSE DSAVYYCARRNEYYGSSFFDYW GQGTTTLTVSS
	CONECTOR	SEQ ID N°: 78	<u>AKTTAPSVYPLAP</u>
	9H10 VH	SEQ ID N°: 145	QVILKESGPGILQPSQTLTLTCSF

			SGFSLSTYGTAVNWIRQPSGKG LEWLAQIGSDDRKLNPFLKSRI TLSEDTSNSQVFLKITSVDTEDS ATYYCANGVMEYWGLGTSVTV SS
	CH	SEQ ID N°: 146	AKTTAPSVYPLAPVCGD TTGSS VTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSG SLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSS VTVTSSTWPSQSITCNVAHPAS STKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKC PAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQIS WVFNNEVHTAQTQTHREDYN STLRVVSALPIQHQDWMSGKEF KCKVNNKDLPAPIERTISKPKGS VRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVT LTCMVTD FMPEDIYVEWTNNGK TELNYKNTEPVLDSDGSYFMYS KLRVEKKNWVERNSYSCSVVHE GLHNHHTTKSFSRTPGK
VARIABLE LIVIANA de mL-		SEQ ID N°: 147	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC RGSGILHNYLVWYQQKQKGKSPQ

1α/β DVD-Ig			LLVYSAKILADGVPSRFSGSGSG TQYSLKINSLQPEDFGSYQCQHF WSTPFTFGSGTKLEIKR <u>ADAAPT</u> <u>VSIFPP</u> SIVMTQTPKFLLVSAGDR VTITCKASQSVNHDVAWYQQMP GQSPKLLIYFASNRYTGVPDRFT GSGYGTDFTFITSTVQAEDLAVY FCQQDYSSPYTFGGGTKLEIKR
	10G11 VL	SEQ ID N°: 148	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC RSGGILHNYLVWYQQKQKSPQ LLVYSAKILADGVPSRFSGSGSG TQYSLKINSLQPEDFGSYQCQHF WSTPFTFGSGTKLEIKR
	CONECTOR	SEQ ID N°: 70	<u>ADAAPTVSIFPP</u>
	9H10 VL	SEQ ID N°: 149	SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCK ASQSVNHDVAWYQQMPGQSPK LLIYFASNRYTGVPDRFTGSGYG TDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQD YSSPYTFGGGTKLEIKR
	CL	SEQ ID N°: 150	ADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGAS VVCFLNNFYPKDINVKKWIDGSE RQNGVLNSWTDQDSKDSTYSM

			SSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATH KTSTSPIVKSFNRNEC
--	--	--	--

Las proteínas de unión DVD-Ig mL-1 α / β de murinos retuvieron la afinidad/potencia *in vitro* contra ambas IL-1 α (mIL-1 α) de murino e IL-1 β (mIL-1 β) de murino. En la Tabla 18 se muestra la caracterización de los mAbs 9H10 (anti-mIL-1 α), 10G11 (anti-mIL-1 β) y proteínas de unión DVD-Ig mL-1 α / β .

Tabla 18. Caracterización de mDVD4-Ig

	Antígeno	K _D (M)	IC ₅₀ (M)
9H10	mIL-1 α	1,73 x 10 ⁻¹⁰	2,00 x 10 ⁻¹⁰
10G11	mIL-1 β	2,30 x 10 ⁻¹⁰	3,70 x 10 ⁻¹⁰
mIL-1 α / β DVD-Ig	mIL-1 α	7,66 x 10 ⁻¹⁰	2,00 x 10 ⁻⁹
	mIL-1 β	6,94 x 10 ⁻¹⁰	8,00 x 10 ⁻¹⁰

Ejemplo 3.2. Actividad *in vivo* de proteínas de unión DVD-Ig mL-1 α / β en el modelo de artritis reumatoide

Se evaluaron los efectos terapéuticos de anti-IL-1 α , anti-IL-1 β , anti-IL-1 α /anti-IL-1 β combinados y DVD4-Ig IL-1 α / β de murino, en un modelo de artritis inducida por colágeno en ratón bien conocido en el arte. Brevemente, se inmunizaron ratones macho DBA-1 con colágeno tipo II de bovino en CFA por la base de la cola. Los ratones recibieron refuerzos con Zimosán por vía intraperitoneal (i.p) el día 21. Después del comienzo de la enfermedad los días 24-27, se seleccionaron los ratones y se dividieron en grupos separados de 10 ratones cada uno. La calificación promedio de artritis del grupo control y de los grupos anti-citoquina era comparable al comienzo del tratamiento. Para

neutralizar la IL-1, los ratones recibieron inyecciones día por medio de 1-3 mg/kg de mAb anti-IL-1 α , mAb anti-IL-1 β , una combinación de mAbs anti-IL-1 α y anti-IL-1 β , o de IL-1 α/β DVD4-Ig de murino por vía intraperitoneal. Los ratones fueron examinados cuidadosamente tres veces por semana por el aspecto visual de la artritis en las articulaciones periféricas y se determinaron las calificaciones para la actividad de la enfermedad.

El bloqueo de la IL-1 en el modo terapéutico redujo eficazmente la severidad de la artritis, donde el anti-IL-1 β mostró una mayor eficacia (24% de reducción en la calificación promedio de artritis en comparación con el grupo control) que el anti-IL-1 α (10% de reducción). Se observó un efecto aditivo entre anti-IL-1 α y anti-IL-1 β , con un 40% de reducción en la calificación promedio de artritis en los ratones tratados con ambos mAbs anti-IL-1 α y anti-IL-1 β . Sorprendentemente, al mismo nivel de dosis, el tratamiento con la proteína de unión mDVD-Ig exhibió un 47% de reducción en la calificación promedio de artritis, demostrando así la eficacia terapéutica *in vivo* de la proteína de unión mDVD-Ig. También se observó una eficacia similar en las mediciones de la hinchazón de la articulación en este modelo en animales.

Ejemplo 3.3. Actividad *in vivo* de una proteína de unión IL-1 α/β DVD-Ig de murino en modelos de osteoartritis

El estudio anterior mostró que el bloqueo de ambas IL-1 α e IL-1 β con una combinación de anticuerpos anti-IL-1 α e IL-1 β de ratón así como proteínas de unión DVD-Ig anti-IL-1 α/β de ratón de murinos era significativamente más eficaz que cualquiera de los anticuerpos individuales solos en el modelo de artritis

inducida por colágeno (CIA) en ratón para la artritis reumatoide (véase, también, Wu et al., *Nature Biotech.*, 25(11): 1290-1297 (2007)). La eficacia de la terapia anti-IL-1 en la osteoartritis (OA) se estudió en dos modelos de OA en animales, es decir, el modelo con inestabilidad de la articulación ("JIM") y con desestabilización del menisco medio ("DMM") en ratones.

Ejemplo 3.3.1. Actividad *in vivo* de los anticuerpos monoclonales anti-IL-1 α de murino y anti-IL-1 β de murino de ratón en el modelo con inestabilidad de la articulación (JIM) de osteoartritis en ratones

Ejemplo 3.3.1.A. Diseño del estudio

El diseño del estudio de la actividad *in vivo* de una molécula de mIL-1 α/β DVD-Ig en el modelo con inestabilidad de la articulación (JIM) de osteoartritis en ratones se muestra en la Tabla 19. Todos los grupos contenían 25 ratones ($n = 25$), que pesaban aproximadamente 30 gramos (PC = 30 g). El estudio se terminó después de 21 días. Se anestesiaron ratones Swiss Webster machos de dos meses y medio de vida (25/grupo/punto de tiempo), albergados a razón de 5/jaula, con anestesia de isoflurano. Se practicaron traumatismos en el ligamento cruzado anterior (ACL) en las rodillas derecha e izquierda el día 0 en un intento por inducir lesiones de OA. Los tratamientos intraperitoneales (ip) con los anticuerpos inhibidores de IL-1, IL-1 α (9H10) e IL-1 β (10G11), solos y combinados, comenzaron el día del traumatismo del ACL y continuaron cada 4 días (q4d) durante 20 días. El vehículo para el control sin tratamiento era PBS. Se recolectaron las rodillas derecha e izquierda el día 21, y se calificaron las alteraciones histopatológicas y se caracterizaron. Los datos se analizaron usando

solamente las articulaciones que mostraron respuestas proliferativas indicativas de una inducción exitosa de inestabilidad. La respuesta proliferativa/inestabilidad se calificó con 0-3, y solamente se usaron las articulaciones inestables (calificaciones de 1, 2 ó 3) en el análisis final. Se calificó la degeneración del cartílago medial y lateral femoral y tibial por la severidad de la degeneración del cartílago en una escala de 0-5. Cuatro días después de la última dosis de anticuerpo, se extrajo sangre de todos los animales de cada grupo a fin de recuperar el suero. Los pesos corporales se registraron semanalmente. El último día, los animales (10 animales en los Grupos 1, 2, 3, 4) recibieron dosis de Zimosán A y se extrajo sangre 4 horas después (al terminar) para el análisis del suero por IL-6 (dependiente de IL-1/TNF). Los animales fueron sacrificados el día 21 y se recolectaron las articulaciones de las rodillas derecha e izquierda en formalina.

Table 19: Diseño del estudio en el modelo de osteoartritis con inestabilidad de la articulación en animales

Grupo de tratamiento	Compuesto	Ruta	Régimen de dosificación
Grupo 1	Vehículo 1 (PBS)	ip	Q4D (2 veces por semana)
Grupo 2	anti-IL-1 α (9H10)	ip	Q4D (2 veces por semana)

			semana)
Grupo 3	anti-IL-1 β (10G11)	ip	Q4D (2 veces por semana)
Grupo 4	anti-IL-1 α (9H10) y anti-IL-1 β (10G11)	ip	Q4D (2 veces por semana)

Ejemplo 3.3.1.B. Preparación y análisis del tejido

Preparación del tejido: Después de 2-3 días en un fijador descalcificante (Surgipath Decalifier, Surgipath Medical Ind., Inc., Richmond VA), se disecaron los tejidos extraños de las articulaciones de rodillas, se embebieron por el plano frontal y se cortaron secciones. Se tomó una sección de cada animal (2 articulaciones/bloque) aproximadamente por el punto medio del plano frontal. Todas las secciones eran de 8 μ m de espesor y se tiñeron con azul de toluidina. Los cortes fueron examinados por un patólogo veterinario certificado, ciego para la designación de los grupos de estudio y se calificaron de acuerdo con el siguiente método. El análisis estadístico se efectuó usando Microsoft Excel, e incluía una prueba t de 2 colas que compara todos los grupos de tratamiento con el grupo control usando un nivel de confianza del 95%.

Calificación histopatológica de las articulaciones: La degeneración del

cartílago medial y lateral femoral y tibial se calificó por la severidad de la degeneración del cartílago usando el siguiente sistema: Profundidad/extensión de la pérdida de condrocitos y proteoglucano con fibrilación :

1: daño superficial, capa tangencial de colágeno ausente en más del 50% o más de la superficie de la zona o hasta un 10% de pérdida de proteoglucano y/o condrocitos en distribución focal o difusa en la zona

2: la pérdida de matriz se extiende hasta un 50% dentro del cuarto superior o un área mayor de la zona o hasta un 25% de pérdida de proteoglucano y/o de condrocitos en distribución focal o difusa en la zona

3: la pérdida de matriz se extiende a través de la $\frac{1}{2}$ del espesor del cartílago en el 50% o más de la zona o hay hasta un 50% de pérdida de proteoglucano y/o condrocitos en distribución focal o difusa en la zona

4: la pérdida de matriz se extiende a través de la $\frac{3}{4}$ partes del espesor del cartílago en el 50% o más de la zona o hay hasta un 75% de pérdida de proteoglucano y/o condrocitos en distribución focal o difusa en la zona

5: la pérdida de matriz se extiende a través de todo el espesor del cartílago en el 50% o más de la zona o hay hasta un 100% de pérdida de proteoglucano y/o condrocitos en distribución focal o difusa en la zona

Las calificaciones fueron asignadas con atención a la distribución zonal (interna, media y externa) de las lesiones, y se sumaron las calificaciones (0-5) para cada tercio por cada área de la articulación y luego para toda la articulación.

Se midieron los osteofitos (más grande sobre la superficie tibial o femoral bajo evaluación) usando un software digital (NIS-Elements, versión 3.0).

Evaluación del osteofito = 1, 2 ó 3 para pequeño, mediano o grande dependiendo del tamaño

Osteofitos pequeños = 1 (hasta 150 μm)

Osteofitos medianos = 2 (151-300 μm)

Osteofitos grandes = 3 (>301 μm)

La reacción sinovial se describió y caracterizó con respecto al tipo y grado de inflamación, si existe, pero no se incluyó en la calificación.

Se determinó la media $\pm$ DE para cada uno de los distintos parámetros para cada animal y se sumó para obtener una calificación total para la articulación.

Las articulaciones con evidencia histológica de inducción de inestabilidad fueron identificadas por la presencia de cambios proliferativos en los ligamentos sinoviales medial y colateral. Además, se registró una calificación de inestabilidad para cada articulación de acuerdo con los siguientes criterios.

0 = No hay inestabilidad

1 = Inestabilidad leve (mínima a cambios proliferativos leves en ligamentos y zonas marginales)

2 = Inestabilidad moderada (cambios proliferativos moderados en ligamentos y zonas marginales)

3 = Inestabilidad severa (cambios proliferativos severos en ligamentos y zonas marginales)

Resultados: Solamente las articulaciones inestables con calificaciones de 1, 2 ó 3 (o 2, 3) se usaron en el análisis final de los datos. Los datos fueron analizados finalmente sobre una base de articulación total afectada en lugar de

una base de animal afectado. Los resultados de este estudio indicaron que las articulaciones de animales tratados con anticuerpos monoclonales anti-IL-1 α o IL-1 β mostraron una degeneración del cartílago similar a la observada en las articulaciones control tratadas con vehículo. Sin embargo, una terapia combinada con un mAb anti-IL-1 α de ratón de ratón (9H10) y un mAb anti-IL-1 β de ratón de ratón (10G11) disminuyó significativamente las calificaciones de la degeneración del cartílago tibial medial. En la Figura 2 se muestran gráficos de barra de las calificaciones de la degeneración del cartílago en las articulaciones de los animales en los diversos grupos de tratamiento.

Ejemplo 3.3.2. Actividad *in vivo* de la proteína de unión mL-1 α / β DVD-Ig en el modelo con inestabilidad de la articulación (JIM) de osteoartritis en ratones

El modelo con inestabilidad de la articulación de osteoartritis descrito previamente en el Ejemplo 3.3.1, también se usó para comparar la eficacia de la terapia anti-IL-1 provista por una combinación de un anticuerpo monoclonal anti-mL-1 α de ratón (9H10) y un anticuerpo monoclonal anti-mL-1 β de ratón (10G11) con el provisto por una proteína de unión mL-1 α / β DVD-Ig generada a partir de los dos anticuerpos monoclonales.

Ejemplo 3.3.2.A. Diseño del estudio

El diseño de este estudio era similar al descrito previamente en el Ejemplo 3.3.1. Se anestesiaron ratones Swiss Webster machos, de dos meses y medio de vida, (25/grupo/punto de tiempo), albergados a razón de 5/jaula, con anestesia de isoflurano y se cortó el área de la rodilla derecha e izquierda y se preparó para

practicar un traumatismo intra-articular en los ligamentos cruzados el día 0. La dosificación (iniciado el día 0, ip) se llevó a cabo una vez cada 4 días (Q4D) con animales terminándose el día 21 (para el Grupo 2). La dosificación (iniciado el día 0, ip) se llevó a cabo tres veces por semana en los animales terminándose el día 21 (para los Grupos 1, 3 y 4). Cuatro días después de la última dosis de anticuerpo, se extrajo sangre de todos los animales de cada grupo para recuperar el suero. Los pesos corporales se registraron semanalmente. El último día, los animales (10 animales en los Grupos 1, 2, 3, 4) recibieron dosis de Zimosán A y se extrajo sangre 4 horas después (al terminar) para el análisis del suero por IL-6 (dependiente de IL-1/TNF). Los animales fueron sacrificados el día 21 y se recolectaron las articulaciones de las rodillas derecha e izquierda en formalina. Véase la tabla del diseño del estudio a continuación.

Tabla 20. Diseño del estudio del modelo de osteoartritis con inestabilidad de la articulación en animales

Grupo de tratamiento	Compuesto	Ruta	Régimen de dosificación	Nivel de dosis (mg/kg)
Grupo 1	Vehículo 1 (PBS)	ip	3 veces por semana	6,7 ml/kg
Grupo 2	anti-IL-1 α (9H10) y	ip	Q4D (3 veces por semana)	anti-IL-1 α a 6 mg/kg (180 μ g/ratón)

	anti-IL-1 β (10G11)			y anti-IL-1 β a 6 mg/kg (180 μ g/ratón)
Grupo 3	mIL-1 α/β DVD-Ig	ip	3 veces por semana	12 mg/kg (500 μ g/ratón)
Grupo 4	mIL-1 α/β DVD-Ig	ip	3 veces por semana	6 mg/kg (250 μ g/ratón)

Ejemplo 3.3.2.B. Preparación y análisis del tejido

La preparación del tejido y la calificación histológica del cartílago articular de las articulaciones de los animales en los distintos grupos de tratamiento se llevaron a cabo como se describió previamente en el Ejemplo 3.3.1.

Resultados: Los resultados indicaron que el tratamiento de los ratones con la proteína de unión mIL-1 α/β 10G11-9H10 DVD-Ig inhibió significativamente el progreso de la osteoartritis ($P < 0,05$ versus vehículo) con una eficacia comparable a la de la combinación de los mAbs parentales 9H10 y 10G11. En la Figura 3 se muestran gráficos de barra de las calificaciones de la degeneración del cartílago en las articulaciones de los animales en los diversos grupos de tratamiento. Según se muestra en la Figura 3, los resultados del tratamiento con 6 ó 12 mg/kg de la proteína de unión DVD-Ig eran similares en cuanto a su eficacia en términos de prevenir las lesiones osteoartísticas. (Un tratamiento con 3 mg/kg de la proteína de unión DVD-Ig no tuvo efecto sobre la degeneración del cartílago y los resultados fueron similares a las articulaciones tratadas con

vehículo. Véase, el Ejemplo 3.3.3, a continuación.) Los resultados de este estudio indicaron que el tratamiento con una combinación de anticuerpos monoclonales anti-IL-1 α y anti-IL-1 β o con una proteína de unión IL-1 α / β DVD-Ig tenía efectos beneficiosos significativos sobre los parámetros histopatológicos en el modelo de osteoartritis en ratón.

Ejemplo 3.3.3. Estudio de seguimiento en el modelo de osteoartritis con inestabilidad de articulaciones para comparar el tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β y otras proteínas de unión

Se condujo un estudio de seguimiento usando el modelo de osteoartritis con inestabilidad de articulaciones para determinar más estrechamente si podía haber, o no, algún efecto significativo sobre las calificaciones de la degeneración del cartílago medial de la tibia en animales tratados con un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β solamente en comparación con otros tratamientos. El efecto del tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β se evaluó en un estudio de 21 días.

Ejemplo 3.3.3.A. Diseño del estudio

El diseño de este estudio era similar al descrito previamente en el Ejemplo 3.3.1.

Tabla 21. Diseño del modelo de osteoartritis con inestabilidad de la articulación de 21 días en animales

Grupo de tratamiento	Compuesto	Ruta	Régimen de dosificación	Nivel de dosis (mg/kg)
----------------------	-----------	------	-------------------------	------------------------

Grupo 1	Vehículo 1 (PBS)	ip	Q4D	6,7 ml/kg
Grupo 2	anti-IL-1 α (9H10) y anti-IL-1 β (10G11)	ip	Q4D	anti-IL-1 α a 6 mg/kg (180 μ g/ratón) y anti-IL-1 β a 6 mg/kg (180 μ g/ratón)
Grupo 3	anti-IL-1 β (10G11)	ip	Q4D	12 mg/kg (360 μ g/ratón)
Grupo 4	anti-IL-1 β (10G11)	ip	Q4D	6 mg/kg (180 μ g/ratón)
Grupo 5	anti-IL-1 β (10G11)	ip	Q4D	3 mg/kg (90 μ g/ratón)

Ejemplo 3.3.3.B. Preparación y análisis del tejido

La preparación del tejido y la calificación histológica del cartílago articular de las articulaciones de los animales en los distintos grupos de tratamiento se llevaron a cabo como se describió previamente en el Ejemplo 3.3.1.

Resultados: Según se muestra en la Figura 4, los resultados confirmaron los de los estudios previos, donde se notaron efectos positivos similares del tratamiento usando una combinación de anticuerpos monoclonales anti-IL-1 α y

anti-IL-1 β y que el tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β solamente no era eficaz para prevenir la degradación del cartílago a cualquier dosis evaluada.

Ejemplo 3.3.4. Producción de interleuquina-6 (IL-6) inducida por zimosán en un modelo de estudio con inestabilidad de la articulación

Como una lectura farmacodinámica para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-IL-1 α y anti-IL-1 β , así como la proteína de unión mIL-1 α/β DVD-Ig, eran funcionales y capaces de neutralizar la IL-1 α y la IL-1 β *in vivo*, se midió la producción de interleuquina 6 (IL-6) inducida por zimosán (dependiente de IL-1 α e IL-1 β) en un modelo de estudio de OA con inestabilidad de la articulación.

Brevemente, el día 21 del modelo, se suspendió zimosán en vehículo de PBS y se colocó en agua en ebullición por media hora, luego se dejó enfriar antes de usarlo. A continuación, los ratones recibieron inyecciones ip con 50 mg/kg de zimosán en suspensión (mezclar bien antes de la inyección) en 0,5 ml de PBS. Los ratones se dejaron desangrar 4 horas después de la inyección con zimosán. Se recolectó suero para las mediciones de IL-6.

Resultados: Según se muestra en la Figura 5, una combinación del anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α (6 mg/kg) y del anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β (6 mg/kg) anticuerpos monoclonales, así como la proteína de unión mIL-1 α/β DVD-Ig (a 6 mg/kg o a 12 mg/kg), neutralizó significativamente la producción de IL-6 inducida por zimosán en comparación con los animales control tratados con vehículo. Por lo tanto, los anticuerpos presentaron actividad funcional *in vivo*.

Ejemplo 3.3.5. Efecto de los tratamientos con anticuerpos inhibidores de citoquinas sobre el modelo de osteoartritis inducida por desestabilización del menisco medio (DMM) en ratones SV129

También se empleo modelo alternativo en animales para estudiar el efecto de la actividad anti-IL-1 α y anti-IL-1 β sobre el retardo del progreso de la degeneración del cartílago en la osteoartritis. El modelo de desestabilización del menisco medio (DMM) en ratón para osteoartritis es menos invasivo e inflamatorio que el procedimiento JIM (véase, precedentemente) y da como resultado lesiones ubicadas primariamente sobre la región central que soporta el peso del plateau medial tibial y el cóndilo medial femoral. La severidad y la ubicación de las lesiones después de DMM son más consistentes en comparación con JIM.

Ejemplo 3.3.5.A. Diseño del estudio

Se anestesiaron ratones SV129 que pesaban aproximadamente 30 gramos, albergados a razón de 5/jaula, el Día 0 con un cóctel de ketamina/xilazina, administrado por vía intraperitoneal (ip), y luego se expuso el ligamento medial colateral por disección roma y se transectó para reflejar el menisco hacia el fémur. El espacio de la articulación se cerró con una sutura de vicrilo 8-0. La piel se cerró con pegamento para heridas. Para las cirugías simuladas, se practicó una incisión vertical en la piel sobre el aspecto medial de la rodilla y se abrió la cápsula de la articulación. La cápsula se cerró con sutura de vicrilo 8-0 y la piel se cerró con pegamento para heridas. Luego los grupos de animales fueron tratados con inyecciones por vía intraperitoneal (ip) de anticuerpo o vehículo de acuerdo con el diseño del estudio que se muestra en la siguiente

tabla. También se incluyeron dos ratones naïve apareados por sexo, apareados por edad y apareados por cepa en el estudio. Los animales fueron sacrificados después de 8 semanas de tratamiento, y se recolectaron las articulaciones de rodilla en 10% de formalina neutra.

Tabla 22. Diseño del estudio usando el modelo de osteoartritis con desestabilización del menisco medial (DMM)

Grupo de tratamiento	Compuesto	Cantidad de animales (n)	Dosis, ruta y régimen	Punto de tiempo del sacrificio
A	simulada (ninguno)	5	ninguno	8 semanas
B	vehículo (PBS)	10	ip, 3x/semana	8 semanas
C	mAb anti-IL-1 α y mAb anti-IL-1 β	11	180 μ g/ratón por cada anticuerpo, ip, cada 4 días	8 semanas
D	mIL-1 α/β DVD-Ig	10	250 μ g/ratón, ip, 3x/semana	8 semanas

Ejemplo 3.3.5.B. Examen de los tejidos

Se decalcificaron las muestras fijadas en formalina y los especímenes se cortaron en secciones en el plano frontal en 15 pasos de secciones cada uno. Cada sección era de aproximadamente 6 μm de espesor y las secciones de paso estaban separadas por 70 μm . Todos los cortes se tiñeron con azul de toluidina (*T. Blue*). Los cortes fueron evaluados de acuerdo con el método de Chambers (Chambers et al., (2001) *Arthritis Rheum* 44: 1455-65) por la degeneración del cartílago (véase más adelante) por un patólogo veterinario certificado. Cada una de las cuatro superficies de cartílago, el cóndilo medial femoral (MFC), el plateau medial tibial (MTP), el cóndilo lateral femoral (LFC) y el plateau tibial lateral (LTP), fueron calificados de 0-6 de acuerdo con la escala que se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 23. Sistema de Calificación de Chambers para la degeneración del cartílago

Grado	Daño osteoartítico
0	No hay daño
1	Superficie articular áspera y pequeñas fibrilaciones
2	Fibrilación descendente hasta la capa inmediatamente debajo de la capa superficial (zona 2) y alguna pérdida de la lámina superficial
3	Pérdida de la lámina superficial y

	fibrilaciones que se extienden hasta el cartílago calcificado
4	Grandes fibrilaciones y erosión del cartílago hasta el hueso subcondral
5	Grandes fibrilaciones y erosión de hasta un 80% del cartílago
6	Más del 80% de pérdida de cartílago

El análisis estadístico se llevó a cabo usando el software GraphPad Prism versión 4.03 usando la prueba U de Mann-Whitney.

Ejemplo 3.3.5.C. Resultados

Según se muestra en la Figura 6, una terapia combinada con el anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α de ratón (9H10, 6 mg/kg) y el anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β de ratón (10G11, 6 mg/kg) o con la proteína de unión IL-1 α / β DVD-Ig (6 mg/kg) redujo significativamente la degeneración del cartílago en el modelo de osteoartritis con DMM en ratón.

Ejemplo 3.3.6. Titulación de las actividades anti-IL-1 α y anti-IL-1 β en ratones en un modelo de osteoartritis con desestabilización del menisco medio (DMM) (estudio de 8 semanas)

Se condujo un estudio de 8 semanas acerca de los efectos sobre la degeneración del cartílago como respuesta a varias dosis de anticuerpo monoclonal anti-mIL-1 α (9H10 mAb) y anticuerpo monoclonal anti-mIL-1 β (10G11 mAb), solo o en combinación, y de la proteína de unión mIL-1 α / β 10G11-9H10 DVD-Ig en el modelo de osteoartritis con DMM.

Ejemplo 3.3.6.A. Diseño del estudio

Se anestesiaron ratones SV129 que pesaban aproximadamente 30 gramos, albergados a razón de 5/jaula, el Día 0 con un cóctel de ketamina/xilazina, administrado por vía intraperitoneal (ip), y luego se expuso el ligamento medial colateral por disección roma y se transectó para reflejar el menisco hacia el fémur. El espacio de la articulación se cerró con una sutura de vicrilo 8-0. La piel se cerró con pegamento para heridas. Para las cirugías simuladas, se practicó una incisión vertical en la piel sobre el aspecto medial de la rodilla y se abrió la cápsula de la articulación. La cápsula se cerró con sutura de vicrilo 8-0 y la piel se cerró con pegamento para heridas. Los grupos de animales fueron tratados luego con inyecciones por vía intraperitoneal (ip) del anticuerpo monoclonal anti-mIL-1 α , anti-mIL-1 β (solo o en combinación), la proteína de unión mIL-1 α / β DVD-Ig o vehículo de acuerdo con el diseño del estudio que se muestra en la siguiente tabla (Tabla 24). Los animales fueron sacrificados después de 8 semanas de tratamiento, y se recolectaron las articulaciones de rodilla en 10% de formalina neutra.

Tabla 24. Diseño del estudio para evaluar varios tratamientos en el modelo de osteoartritis con DMM

Grupo de tratamiento	Compuesto	Cantidad de animales (n)	Dosis, ruta y régimen	Punto de tiempo del sacrificio

A	Simulado (Ninguno)	5	Ninguno	8 semanas
B	Vehículo (PBS)	10 (9)	ip, 3x/semana	8 semanas
C	anti-IL-1 α (9H10)	10 (5)	180 μ g/ratón, ip, cada 4 días	8 semanas
D	anti-IL-1 β (10G11)	10 (8)	180 μ g/ratón, ip, cada 4 días	8 semanas
E	anti-IL-1 α (9H10) + anti-IL-1 β (10G11)	10 (8)	180 μ g/ratón por cada anticuerpo, ip, cada 4 días	8 semanas
F	mIL-1 $\alpha\beta$ DVD- Ig	10 (9)	62,5 μ g/ratón, ip, 3x/semana	8 semanas
G	mIL-1 $\alpha\beta$ DVD- Ig	10	125 μ g/ratón, ip, 3x/semana	8 semanas
H	mIL-1 $\alpha\beta$ DVD- Ig	10	250 μ g/ratón, ip, 3x/semana	8 semanas

Los números entre paréntesis en la columna 3 de la tabla anterior (N° de animales) representan la cantidad real de animales incluidos en el conjunto de datos. A continuación, se provee una descripción breve de las exclusiones:

Grupo B: Solamente se incluyeron 9 animales en el Grupo B. Un animal se

excluyó del conjunto de datos porque al realizar el examen histológico, el menisco medio estaba intacto y esencialmente no había ningún cambio osteoartrítico.

Grupo C: Solamente se incluyeron 5 animales en el Grupo C. Se excluyeron cinco animales del conjunto de datos porque al realizar el examen histológico el menisco medio estaba mayormente intacto y había poco cambio osteoartrítico.

Grupo D: Solamente se incluyeron 8 animales en el Grupo D. Faltaban los cortes correspondientes a un animal. Se excluyó otro animal del conjunto de datos porque al realizar el examen histológico el menisco medio estaba mayormente intacto y había poco cambio osteoartrítico.

Grupo E: Solamente se incluyeron 8 animales en el Grupo E. Se excluyeron dos animales porque eran considerados como salientes.

Grupo F: Solamente se incluyeron 9 animales en el Grupo F. Un animal se excluyó del conjunto de datos porque al realizar el examen histológico, el menisco medio estaba intacto y esencialmente no había ningún cambio osteoartrítico.

Ejemplo 3.3.6.B. Preparación y examen del tejido

Los tejidos se prepararon y calificaron como se describió previamente en el Ejemplo 3.3.5.

Ejemplo 3.3.6.C. Resultados

Los resultados se muestran en la figura 7. De manera similar a los resultados obtenidos en el modelo de osteoartritis (anterior) con inestabilidad de la articulación (JIM), el tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α (9H10) o con el anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β (10G11) solos dio como resultado una

disminución en la degeneración del cartílago que no era estadísticamente significativo con respecto al observado en las articulaciones con control de vehículo. Sin embargo, una terapia combinada con ambos anticuerpos monoclonales o con la proteína de unión IL-1 α / β DVD-Ig (excepto por IL-1 α / β DVD a 1,5 mg/kg) redujo significativamente la suma del promedio de las calificaciones de Chambers (indicativo de una degeneración global del cartílago) y la media máxima de las calificaciones de Chambers (área más afectada en la articulación). Se observó un efecto de la dosis estadísticamente significativo para el promedio de la suma de las calificaciones de Chambers en los grupos de tratamiento con mL-1 α / β DVD-Ig. Por lo tanto, en este estudio, 8 semanas de tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-mIL-1 α y con el anticuerpo monoclonal anti-mIL-1 β (6 mg/kg, cada uno) y con la proteína de unión mL-1 α / β DVD-Ig (a 3 y 6 mg/kg) alivió el progreso de la degeneración del cartílago inducida en el modelo de osteoartritis con DMM.

Ejemplo 3.3.7. Efectos de las actividades anti-IL-1 α y anti-IL-1 β y del tratamiento de moléculas pequeñas sobre la degeneración del cartílago en animales en el modelo de osteoartritis con desestabilización de menisco medio (DMM)

Se ha demostrado que la Doxiciclina previene la degradación del cartílago en el modelo de osteoartritis con DMM (*Effects of Disease-modifying Osteoarthritis Drugs in an in-vivo Animal Model*), Silva et al., Univ. Mass. Med. School, Worcester, MA, EE.UU., Trans ORS 2009 – cita completa) y también en un ensayo clínico en humanos (Brandt et al., (2005) *Arthrit. Rheum.* 52(7): 2015-

2025). En este estudio, el efecto del tratamiento de animales en el modelo de DMM con doxiciclina se compara con el efecto del tratamiento de animales con una combinación de anticuerpos monoclonales anti-IL-1 α y anti-IL-1 β .

Ejemplo 3.3.7.A. Diseño del estudio

A ratones SV129 macho que pesan aproximadamente 30 gramos se les expuso el ligamento medial colateral expuesto por disección roma, y se transectó para reflejar el menisco hacia el fémur. El espacio de la articulación se cerró con una sutura de vicrilo 8-0. La piel se cerró con pegamento para heridas. Para las cirugías simuladas, se practicó una incisión vertical en la piel sobre el aspecto medial de la rodilla y se abrió la cápsula de la articulación. La cápsula se cerró con sutura de vicrilo 8-0 y la piel se cerró con pegamento para heridas. Los grupos de animales fueron tratados luego mediante inyecciones *per os* (po) o por vía intraperitoneal (ip) de vehículo o los tratamientos de acuerdo con el diseño de estudio indicado en la siguiente tabla. También se incluyeron tres ratones naïve apareados por sexo, apareados por edad y apareados por cepa en el estudio. Los animales fueron sacrificados después de 4 semanas de tratamiento, y se recolectaron las articulaciones de rodilla en 10% de formalina neutra.

Tabla 25. Diseño del estudio para evaluar diversos tratamientos con anticuerpos anti-IL-1 y Doxiciclina en modelo de osteoartritis con DMM

Grupo	Compuesto	Cantidad de animales	Dosis, ruta y régimen	Punto de tiempo del sacrificio

		(n)		
A	Simulado (Ninguno)	3	Ninguno	4 semanas
B	Vehículo (0,02% de Tween80/ 0,5% de HPMC)	10	po, BID	4 semanas
C	Doxiciclina	10	30 mg/kg, po, BID	4 semanas
D	anti-IL-1 α (9H10) + anti-IL-1 β (10G11)	10	180 μ g/cada ratón, ip, cada 4 días	4 semanas

Ejemplo 3.3.7.B. Preparación y examen del tejido

Los tejidos se prepararon y calificaron como se describió previamente en el Ejemplo 3.3.5.

Ejemplo 3.3.7.C. Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 8. Bajo las condiciones del estudio, 4 semanas de tratamiento con una combinación de anticuerpos monoclonales anti-IL-1 α y anti-IL-1 β , dosificada a 180 μ g/cada ratón, dio como resultado un alivio significativo de los cambios osteoartóricos inducidos por desestabilización del menisco medio en ratones SV129 macho. La suma de los promedios de las calificaciones de Chambers y el promedio máximo de las calificaciones de Chambers se redujeron significativamente, y las sumas de los promedios totales de las calificaciones de Chambers eran notablemente reducidas por este tratamiento combinado en comparación con el grupo control de vehículo.

El tratamiento con Doxiciclina a razón de 30 mg/kg también dio como resultado un efecto de tratamiento similar, pero la terapia combinada con anticuerpos era más efectiva.

Ejemplo 4. Eficacia para el dolor de una terapia con anti-IL-1 α / β

El modelo DMM también genera un dolor mensurable en los ratones. Recientemente, Malfait et al., (véase, Malfait et al., (2010) *Osteoarthritis Cartilage*, 18: 572-580) mostró una disminución fuerte del umbral de retiro de pata (alodinia mecánica, indicación de dolor) en las patas posteriores después de DMM pero no una cirugía simulada. La eficacia de la terapia anti-IL-1 α / β se estudió en el modelo de DMM en animales. Según se muestra en esta serie de estudios, los ratones con cirugía de DMM eran alodínicos tan pronto como día 7 después de la cirugía y exhibieron una disminución en el umbral de retiro de pata hasta el día 35.

El potencial de la terapia anti-IL-1 para aliviar el dolor se evaluó en el modelo de OA con DMM en ratón en términos de la alodinia mecánica. La dosificación con una combinación de mAbs IL-1 α e IL-1 β se comenzó el día de la cirugía y se repitió dos veces por semana durante 5 semanas. Los animales fueron tratados con vehículo de PBS solamente, con un control de isotipo de IgG o con una combinación de mAbs anti-IL-1 α y anti-IL-1 β (a una dosis de 6 mg/kg para cada mAb). Los animales fueron evaluados semanalmente por el umbral de retiro de pata. La extremidad ipsilateral (quirúrgica) de los grupos tratados con PBS o con el control de isotipo de IgG era alodínica (con dolor) en comparación con la extremidad contralateral (no quirúrgica) o en comparación con animales sometidos a una cirugía simulada. Véase la Figura 9. Por el contrario, el grupo

tratado con la combinación de mAbs anti-IL-1 α y anti-IL-1 β demostró un umbral de retiro de pata significativamente mayor indicativo de una reducción en el desarrollo de alodinia (dolor) en comparación con los grupos tratados con Vehículo de PBS o isotipo de IgG para la semana 5 (día 35). Véase la Figura 10. Esta reducción del dolor se observó tan pronto como en la semana 1 después del tratamiento (no se muestran los datos).

Para evaluar el efecto de la terapia para IL-1 en el dolor establecido, los animales en el grupo de control de IgG con una OA establecida y alodinia mecánica fueron tratados el día 35 con la combinación de anticuerpos monoclonales anti-IL-1 α y anti-IL-1 β y el umbral de retiro de pata se evaluó 24 horas después (día 36). Los datos demostraron que la terapia combinada con mAbs anti-IL-1 α y anti-IL-1 β revirtió la alodinia (dolor de OA reducido) en animales con la enfermedad establecida. Estos datos indican que la terapia anti-IL-1 provee un efecto analgésico independiente de un potencial efecto modificador de la enfermedad. Véase la Figura 11.

Ejemplo 5. Estudio adicional de de la eficacia para el dolor de una terapia combinada con anti-IL-1 α / β

El potencial de la terapia anti-IL-1 para aliviar el dolor se evaluó adicionalmente en el modelo de OA con DMM en ratón (véase precedentemente) en términos de la alodinia mecánica. La dosificación con una combinación de mAbs IL-1 α e IL-1 β se comenzó el día de la cirugía y se repitió dos veces por semana durante 4 semanas. Los animales con DMM fueron tratados con vehículo de PBS solamente, con el mAb anti-IL-1 α (6 mg/kg), con el mAb anti-IL-1 β (6

mg/kg) o con una combinación del mAb anti-IL-1 α (6 mg/kg) y del mAb anti-IL-1 β (6 mg/kg), administrados por vía intraperitoneal (ip) dos veces por semana durante cuatro semanas. Se evaluó la alodinia en los animales el día 28. La extremidad ipsilateral (quirúrgica) de los grupos tratados con vehículo era alodínica (con dolor) en comparación con la extremidad contralateral (no quirúrgica) o en comparación con animales sometidos a una cirugía simulada. Véase la Figura 12. De manera similar, un grupo tratado con mAbs anti-IL-1 α o anti-IL-1 β solamente era alodínico (con dolor). Por el contrario, el grupo tratado con la combinación de mAbs anti-IL-1 α y anti-IL-1 β demostró un umbral de retiro de pata significativamente mayor indicativo de una reducción en el desarrollo de alodinia (dolor) en comparación con los grupos tratados con Vehículo (Figura 12).

Ejemplo 6. Eficacia dependiente de la dosis para el dolor de una terapia combinada con anti-IL-1 α / β

La dosificación de la combinación de los mAbs anti-IL-1 α y anti-IL-1 β se inició el día en que se practicó la cirugía en los animales del modelo de DMM en ratón y se repitió dos veces por semana durante cuatro semanas. Los animales fueron tratados con vehículo de PBS solamente o con una combinación de mAb anti-IL-1 α y mAb anti-IL-1 β , ambos administrados por vía intraperitoneal (ip) cada cuatro días durante cuatro semanas a razón de 1 mg/kg, 3 mg/kg o 6 mg/kg. Los animales fueron evaluados el Día 28 por el umbral de retiro de pata. La extremidad ipsilateral (quirúrgica) de los grupos tratados con vehículo mostró una reducción significativa en el umbral de retiro de pata indicativo de alodinia (dolor) en comparación con la extremidad contralateral (no quirúrgica) o en comparación

con animales sometidos a una cirugía simulada (Figura 13). Por el contrario, el grupo tratado con la combinación de mAbs anti-IL-1 α y anti-IL-1 β demostró un aumento dependiente de la dosis del umbral de retiro de pata indicativo de una reducción en el desarrollo de alodinia (dolor) en comparación con los grupos tratados con Vehículo (Figura 13).

Ejemplo 7. Terapia combinada con anti-IL-1 α / β en el dolor establecido

Para evaluar el efecto de una terapia combinada con anti-IL-1 α / β en el dolor establecido, se trataron animales en el modelo de OA establecida con DMM en ratón y alodinia mecánica el día 27 con una combinación de mAb anti-IL-1 α y mAb anti-IL-1 β , ambos administrados por vía intraperitoneal (ip) a razón de 1 mg/kg, 3 mg/kg o 6 mg/kg a las 24 horas antes de la evaluación de la alodinia el día 28. Los resultados se muestran en la Figura 14. Los datos que la terapia combinada con los mAbs anti-IL-1 α y anti-IL-1 β revirtió la alodinia mecánica (dolor de OA reducido) en animales con enfermedad establecida de una manera relacionada con la dosis (Figura 14).

Ejemplo 8. Efecto anti-hiperalgésico de una terapia combinada con anti-IL-1 α / β

Para evaluar si la neutralización de la IL-1 α y la IL-1 β produce efectos antinociceptivos en las condiciones de dolor inflamatorio, se evaluaron los mAbs anti-IL-1 α y anti-IL-1 β por la capacidad para revertir el dolor establecido en el modelo de dolor nociceptivo.

Se evaluó la eficacia de los mAbs anti-IL-1 α y anti-IL-1 β cuando se administraban solos o en combinación en el modelo con carragenina en ratón

(Figura 15). A las 30 horas después de la inyección intraplantar con carragenina: se administraron 900 μ g del mAb anti-IL-1 α , del mAb anti-IL-1 β o una combinación de los mismos en diferentes grupos de ratones. La prueba de hiperalgesia térmica se llevó a cabo 48 y 96 horas después de la carragenina. Según se observó en el estudio anterior, la dosis combinada de 900 μ g atenuó significativamente la hiperalgesia térmica (pata con carragenina $8,11 \pm 0,62$ s en comparación con $4,98 \pm 0,34$ s en el grupo de PBS a las 48 horas, $p < 0,01$, Figura 15A; pata con carragenina $7,62 \pm 0,45$ s en comparación con $4,45 \pm 0,55$ s en el grupo con PBS a las 96 horas, $p < 0,01$, Figura 15B). El efecto antinociceptivo en el grupo de los 900 μ g de la combinación era de $53 \pm 7\%$ a las 48 horas y $82 \pm 11\%$ a las 96 horas. El grupo de control positivo con diclofenac (analgésico anti-inflamatorio, no esteroide) exhibió nuevamente una atenuación significativa de la hiperalgesia térmica ($p < 0,01$ en ambos puntos de tiempo). Por el contrario, no se observó un efecto antinociceptivo significativo en ambos puntos de tiempo cuando se administraban los mAbs anti-IL-1 α y anti-IL-1 β solos, lo cual es indicativo que es necesaria una neutralización simultánea de ambas IL-1 α e IL-1 β para la eficacia antinociceptiva en el modelo de dolor inflamatorio con carragenina en ratón.

Ejemplo 9. Efecto anti-hiperalgésico dependiente de la dosis con la terapia combinada de anti-IL-1 α/β

Según se muestra en la Figura 16, la inyección intraplantar de carragenina en ratones (BALB/c, hembras) produce una hiperalgesia térmica de duración prolongada como lo evidencia una disminución en la latencia hasta el retiro de

pata frente a un estímulo de calor radiante (prueba realizada 48 y 96 horas después de la inyección de carragenina; $p < 0,01$ para el control no lesionado versus las patas con carragenina en el grupo de Vehículo de PBS en ambos puntos de tiempo). Se trataron diferentes grupos de animales ya sea con vehículo o con una combinación de mAbs anti-IL-1 α y anti-IL-1 β (100, 300 ó 900 μg /ratón, de cada mAb) 30 horas después de la inyección de carragenina. Se observó un efecto relacionado con la dosis, ya que la dosis de 900 μg de la combinación de los mAbs anti-IL-1 α y anti-IL-1 β atenuó significativamente la hiperalgesia térmica (pata con carragenina $3,23 \pm 0,34$ s en PBS en comparación con $7,88 \pm 0,93$ s en los grupos de 900 μg a las 48 horas, $p < 0,01$, Figura 16A; pata con carragenina $4,45 \pm 0,55$ s en PBS en comparación con $7,62 \pm 0,45$ s en los grupos de 900 μg a las 96 horas, $p < 0,01$, Figura 16B). El efecto antinociceptivo en el grupo de tratamiento con los 900 μg era de $70 \pm 9\%$ a las 48 horas y $62 \pm 4\%$ a las 96 horas. El Diclofenac (30 mg/kg), un analgésico anti-inflamatorio, no esteroide, se incluyó como control positivo en el estudio, y aumentó el promedio de latencia hasta el retiro de pata de la pata lesionada a $7,01 \pm 0,58$ s a las 48 horas y $7,48 \pm 0,34$ s a las 96 horas cuando era administrado p.o. 60 minutos antes de la prueba ($p < 0,01$ en ambos puntos de tiempo). Los grupos de control de IgG y de una dosis baja de 100 μg de mAb no atenuó la hiperalgesia térmica en ningún punto de tiempo. Los mAbs y el diclofenac no cambiaban significativamente los valores de latencia hasta el retiro de pata en la pata control no lesionada.

Ejemplo 10. Eficacia de la terapia combinada con anti-IL-1 α/β en el modelo de dolor con CFA

El modelo de dolor inflamatorio con CFA (adyuvante de Freund completo) se usó para evaluar si la combinación de anti-IL-1 α y mAb anti-IL-1 β produciría eficacia contra un punto final mecánico. Por ello, se evaluó la alodinia mecánica usando monofilamentos de von Frey en animales (ratones BALB/c, hembras) 48 horas después que recibieron una inyección intraplantar con CFA. Según se puede observar en la Figura 17A, el CFA intraplantar produjo una fuerte alodinia mecánica como lo demuestra una disminución en el umbral de retiro de pata en la pata inyectada con CFA tratada con vehículo de PBS solamente ($0,052 \pm 0,028$ g versus $0,860 \pm 0,090$ g en la pata contralateral no lesionada, $p < 0,01$). Se trataron grupos de animales separados ya sea con el control de isotipo de IgG o con una combinación de mAbs anti-IL-1 α y anti-IL-1 β ($900 \mu\text{g}$ /ratón, de cada mAb) 30 horas después de la inyección CFA. El grupo tratado con los mAb mostró una atenuación significativa de la alodinia mecánica ($0,419 \pm 0,101$ g, $p < 0,01$ versus el vehículo de PBS, Figura 17A). La magnitud de la eficacia (% MPE) era de $65,51 \pm 12,35\%$ (Figura 17B). El analgésico anti-inflamatorio, de control positivo, diclofenac, (30 mg/kg , 1 hora de pretratamiento) también atenuó la alodinia mecánica al aumentar el umbral de retiro de patas ($0,359 \pm 0,088$ g, $p < 0,01$ versus vehículo de PBS) con un valor de %MPE de $64,51 \pm 10,20\%$.

Ejemplo 11. Eficacia de la terapia combinada con anti-IL-1 α / β en el dolor neuropático

Se examinó si una terapia combinada con los mAb anti-IL-1 α y anti-IL-1 β produciría eficacia en las condiciones de dolor neuropático en un modelo de ligación del nervio espinal L5/L6 (SNL) en ratones (CD1, macho). La prueba se

realizó seis días después de la cirugía SNL, 24 y 72 horas después de tratar a los animales con la combinación de mAb (900 µg /ratón de cada mAb). Se observó alodinia mecánica en los ratones tratados con vehículo de PBS solamente después de una cirugía de SNL como lo demuestra una disminución en el umbral de retiro de pata frente a un estímulo con el monofilamento de von Frey ($0,073 \pm 0,032$ g versus $0,735 \pm 0,109$ g para la pata contralateral a las 24 horas, Figura 18A; $0,128 \pm 0,048$ g versus $0,732 \pm 0,132$ g para la pata contralateral a las 72 horas, Figura 18B; $p < 0,01$ en ambos puntos de tiempo). El grupo tratado con mAb mostró una atenuación significativa de la alodinia mecánica en ambos puntos de tiempo ($0,477 \pm 0,131$ g, $p < 0,01$ versus Vehículo de PBS a las 24 horas, Figura 18A; $0,527 \pm 0,111$ g, $p < 0,01$ versus Vehículo de PBS a las 72 horas, Figura 18B). La magnitud de la eficacia (% MPE) era de $72,20 \pm 14,39\%$ a las 24 horas y $80,62 \pm 12,33\%$ a las 72 horas (Figura 19). El control positivo de gabapentina (100 mg/kg, 1 hora de pretratamiento) era completamente eficaz para atenuar la alodinia mecánica al aumentar significativamente el umbral de retiro de patas ($0,858 \pm 0,077$ g a las 24 horas y $1,138 \pm 0,096$ g a las 72 horas, $p < 0,01$ versus Vehículo de PBS en ambos puntos de tiempo). Por el contrario, el grupo de control de IgG no produjo ningún efecto sobre la alodinia mecánica en ambos puntos de tiempo.

Conclusión de los estudios de tratamiento del dolor

Los resultados de los estudios sobre dolor que se describen en la presente indican que una terapia combinada con anti-IL-1 α/β de acuerdo con la invención es eficaz como tratamiento para cualquier forma de dolor y no sólo el dolor

asociado con la osteoartritis. Dicha terapia combinada con anti-IL-1 α / β se puede usar para tratar el dolor en un individuo que sufre de cualquier tipo de condición de dolor incluyendo, pero en un sentido no taxativo, las condiciones de dolor con alodinia, hiperalgesia y una combinación de alodinia e hiperalgesia. La terapia combinada con anti-IL-1 α / β puede administrarse a un individuo por administración a dicho individuo de una combinación (por ejemplo, una mezcla, la administración concurrente o la administración sucesiva) de las proteínas de unión IL-1 α e IL-1 β , tal como una combinación de anticuerpos monoclonales anti-IL-1 α y anti-IL-1 β , o por administración al individuo de una proteína que se une a ambas IL- α e IL-1 β , tal como un anticuerpo biespecífico o una proteína de unión IL-1 α / β DVD-Ig que se une a ambas IL- α e IL-1 β .

Incorporación a modo de referencia

El contenido de todas las referencias citadas (incluyendo, por ejemplo, las referencias de la literatura, de patentes, de solicitudes de patente y de sitios de Internet) que se pueden encontrar en las citas en toda esta solicitud así como en las figuras se incorporan expresamente y por completo a modo de referencia, así como las referencias citadas en las mismas. En la práctica de la presente invención se emplearán, a menos que se indique de otra manera, las técnicas convencionales de la ciencia farmacéutica, de inmunología, de biología molecular y de biología celular que son bien conocidas en el arte.

Equivalencias

La invención se puede realizar según otras formas específicas sin apartarse del espíritu o las características esenciales de la misma. Por ello, las formas de

realización precedentes se deben considerar en todo sentido como ilustrativas en lugar de limitativas de la invención que se describe en la presente. El alcance de la invención está indicado entonces por las reivindicaciones adjuntas antes que la descripción precedente, y por ende se considera que todos los cambios que caen dentro del significado y rango de equivalencia de las reivindicaciones están incluidos en la presente.

REIVINDICACIONES

1. Un método para tratar la osteoartritis en un individuo, CARACTERIZADO PORQUE comprende el paso de administrar al individuo:

una proteína de unión que se une a la IL-1 α y una proteína de unión que se une a la IL-1 β ;

o

una proteína de unión que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β .

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE dicha proteína de unión que se une a la IL-1 α es un anticuerpo anti-IL-1 α .

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE dicha proteína de unión que se une a la IL-1 β es un anticuerpo anti-IL-1 β .

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE dicha proteína de unión que se une a la IL-1 α es un anticuerpo anti-IL-1 α y dicha proteína de unión que se une a la IL-1 β es un anticuerpo anti-IL-1 β .

5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE dicha proteína de unión que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β es una proteína de unión de un dominio variable dual de inmunoglobulina (DVD-Ig).

6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE dicha proteína de unión que se une a la IL-1 α y dicha proteína de unión que se une a la IL-1 β se formulan en una composición farmacéutica que

comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE dicha proteína de unión que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β se formuló en una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE dicha proteína de unión que se une a la IL-1 α y dicha proteína de unión que se une a la IL-1 β están cristalizadas.

9. El método de acuerdo con 1, CARACTERIZADO PORQUE dicha proteína de unión que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β está cristalizada.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 8, CARACTERIZADO PORQUE dicha proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 α y dicha proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 β se formulan en una composición que comprende un ingrediente y un vehículo polimérico.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 9, CARACTERIZADO PORQUE dicha proteína de unión cristalizada se formula en una composición que comprende un ingrediente y un vehículo polimérico.

12. La composición de acuerdo con la reivindicación 10 ú 11, CARACTERIZADA PORQUE dicho vehículo polimérico es un polímero seleccionado entre uno o más del grupo formado por: ácido poli(acrílico), poli(cianoacrilatos), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(depsipéptido), poli(ésteres), ácido poli(láctico), ácido poli(láctico-co-glicólico) o PLGA, poli(b-hidroxibutirato), poli(caprolactona), poli(dioxanona); poli(etilenglicol),

poli((hidroxipropil)metacrilamida, poli[(órgano)fosfaceno], poli(orto ésteres), alcohol poli(vinílico), poli(vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maleico-alquilvinil éter, polioles plurónicos, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglucanos, polisacáridos sulfatados, mezclas y copolímeros de los mismos.

13. La composición de acuerdo con la reivindicación 10 ú 11, CARACTERIZADA PORQUE dicho ingrediente se selecciona del grupo formado por albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, metoxipolietilenglicol y polietilenglicol.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE además comprende administrar al individuo un segundo agente que proporciona una propiedad deseable.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, CARACTERIZADO PORQUE dicho segundo agente comprende uno o más compuestos del grupo que consiste en budenosida, factor de crecimiento epidérmico, corticosteroides, ciclosporina, sulfasalazina, aminosalicilatos, 6-mercaptopurina, azatioprina, metronidazol, inhibidores de lipoxigenasa, mesalamina, olsalazina, balsalazida, antioxidantes, inhibidores de tromboxano, antagonistas del receptor de IL-1, anticuerpos monoclonales anti-IL-1 β , anticuerpos monoclonales anti-IL-6, factores de crecimiento, inhibidores de elastasa, compuestos de piridinil-imidazol, anticuerpos de TNF, LT, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-23, EMAP-II, GM-CSF, FGF y PDGF, anticuerpos de CD2, CD3, CD4, CD8, CD-

19, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos, metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetilo, leflunomida, una NSAID, ibuprofeno, corticosteroides, prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, IRAK, NIK, IKK, p38, inhibidores de MAP quinasa, inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 β , inhibidores de la enzima convertidora de TNF α , inhibidores de la señalización de células T, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores solubles de citoquinas, receptor soluble de p55 TNF, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, citoquinas antiinflamatorias, IL-4, IL-10, IL-11, IL-11, IL-13 y TGF β .

16. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, 14 y 15, CARACTERIZADO PORQUE dicho paso de administración a dicho sujeto es mediante por lo menos un modo seleccionado entre parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intraventricular, intracerebeloso, intracerebroventricular, intracolónico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraóseo, intrapélvico, intrapericardíaco, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterino, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal y transdérmico.

17. Un método de tratamiento del dolor en un individuo, CARACTERIZADO PORQUE comprende el paso de administrar al individuo:

una proteína de unión que se une a la IL-1 α y una proteína de unión que se une a la IL-1 β , en donde las proteínas de unión se administran al individuo en una mezcla, de manera concurrente o sucesiva;

o

una proteína de unión que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β .

18. El método de tratamiento del dolor de acuerdo con la reivindicación 17, CARACTERIZADO PORQUE el individuo sufre de una condición de dolor seleccionada del grupo que consiste en alodinia, hiperalgesia y una combinación de alodinia e hiperalgesia.

19. El método de acuerdo con la reivindicación 17, CARACTERIZADO PORQUE dicha proteína de unión que se une a la IL-1 α es un anticuerpo anti-IL-1 α .

20. El método de acuerdo con la reivindicación 17, CARACTERIZADO PORQUE dicha proteína de unión que se une a la IL-1 β es un anticuerpo anti-IL-1 β .

21. El método de acuerdo con la reivindicación 17, CARACTERIZADO PORQUE dicha proteína de unión que se une a la IL-1 α es un anticuerpo anti-IL-1 α y dicha proteína de unión que se une a la IL-1 β es un anticuerpo anti-IL-1 β .

22. El método de acuerdo con la reivindicación 17, CARACTERIZADO PORQUE dicha proteína de unión que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β es un anticuerpo biespecífico o una proteína de unión de un dominio variable dual de inmunoglobulina (DVD-Ig).

23. El método de acuerdo con la reivindicación 17, CARACTERIZADO

PORQUE dicha proteína de unión que se une a la IL-1 α y dicha proteína de unión que se une a la IL-1 β se formulan en una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

24. El método de acuerdo con la reivindicación 17, CARACTERIZADO PORQUE dicha proteína de unión que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β se formula en una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25. El método de acuerdo con la reivindicación 17, CARACTERIZADO PORQUE dicha proteína de unión que se une a la IL-1 α y dicha proteína de unión que se une a la IL-1 β están cristalizadas.

26. El método de acuerdo con 17, CARACTERIZADO PORQUE dicha proteína de unión que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β está cristalizado.

27. El método de acuerdo con la reivindicación 25, CARACTERIZADO PORQUE dicha proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 α y dicha proteína de unión cristalizada que se une a la IL-1 β se formulan en una composición que comprende:

opcionalmente, un ingrediente;

y un vehículo polimérico.

28. El método de acuerdo con la reivindicación 26, CARACTERIZADO PORQUE dicha proteína de unión cristalizada que se une a ambas IL-1 α e IL-1 β se formula en una composición que comprende:

opcionalmente, un ingrediente; y

un vehículo polimérico.

29. La composición de acuerdo con la reivindicación 27 ó 28, CARACTERIZADA PORQUE dicho vehículo polimérico es un polímero seleccionado entre uno o más del grupo formado por: ácido poli(acrílico), poli(cianoacrilatos), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(depsipéptido), poli(ésteres), ácido poli(láctico), ácido poli(láctico-co-glicólico) o PLGA, poli(b-hidroxibutirato), poli(caprolactona), poli(dioxanona); poli(etilenglicol), poli((hidroxipropil)metacrilamida, poli[(órgano)fosfaceno], poli(orto ésteres), alcohol poli(vinílico), poli(vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maleico-alquilvinil éter, polioles plurónicos, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglucanos, polisacáridos sulfatados, mezclas y copolímeros de los mismos.

30. La composición de acuerdo con la reivindicación 27 ó 28, CARACTERIZADA PORQUE dicho ingrediente se selecciona del grupo que consiste en albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, metoxipolietilenglicol y polietilenglicol.

31. El método de acuerdo con la reivindicación 17, CARACTERIZADO PORQUE además comprende administrar al individuo un segundo agente que proporciona una propiedad deseable.

32. El método de acuerdo con la reivindicación 31, CARACTERIZADO PORQUE dicho segundo agente comprende uno o más compuestos del grupo que consiste en budenosida, factor de crecimiento epidérmico, corticosteroides, ciclosporina, sulfasalazina, aminosalicilatos, 6-mercaptopurina, azatioprina,

metronidazol, inhibidores de lipoxigenasa, mesalamina, olsalazina, balsalazida, antioxidantes, inhibidores de tromboxano, antagonistas del receptor de IL-1, anticuerpos monoclonales anti-IL-1 β , anticuerpos monoclonales anti-IL-6, factores de crecimiento, inhibidores de elastasa, compuestos de piridinil-imidazol, anticuerpos de TNF, LT, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-23, EMAP-II, GM-CSF, FGF y PDGF, anticuerpos de CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos, metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetilo, leflunomida, una NSAID, ibuprofeno, corticosteroides, prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, IRAK, NIK, IKK, p38, inhibidores de MAP quinasa, inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 β , inhibidores de la enzima convertidora de TNF α , inhibidores de la señalización de células T, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores solubles de citoquinas, receptor soluble de p55 TNF, receptor soluble p75 TNF, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, citoquinas antiinflamatorias, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGF β .

33. El método de tratamiento del dolor en un individuo de acuerdo con la reivindicación 17, CARACTERIZADO PORQUE el individuo sufre de una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que comprende osteoartritis, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, artritis séptica, artritis de Lyme, artritis psoriática, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de intestino inflamatoria,

diabetes mellitus dependiente de insulina, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, dermatitis, escleroderma, enfermedad de injerto versus huésped, rechazo de trasplante de órganos, enfermedad inmune aguda o crónica asociada con el trasplante de órganos, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schoenlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis crónica activa, uveítis, shock séptico, síndrome de shock tóxico, síndrome de sepsis, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasitarias, mielitis transversa aguda, corea de Huntington, mal de Parkinson, mal de Alzheimer, accidente cerebrovascular, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, formas malignas, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, enfermedad de Addison, deficiencia poliglandular tipo I esporádica, deficiencia poliglandular tipo II (síndrome de Schmidt), síndrome de dificultad respiratoria de adultos (agudo), alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía psoriática, artropatía colítica ulcerosa, sinovitis enteropática, artropatía asociada con *Chlamydia*, artropatía asociada con *Yersinia*, artropatía asociada con *Salmonella*, espondiloartropatía, enfermedad ateromatosa/arterioesclerosis, alergia atópica, enfermedad bullosa autoinmune, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, penfigoide, enfermedad por IgA lineal, anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica Coombs positiva, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis miálgica/enfermedad *Royal Free*, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de células gigantes, hepatitis

esclerosante primaria, hepatitis autoinmune criptogénica, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, enfermedades relacionadas con la inmunodeficiencia adquirida, hepatitis B, hepatitis C, inmunodeficiencia común variada (hipogammaglobulinemia variable común), cardiomiopatía dilatada, esterilidad femenina, insuficiencia ovárica, insuficiencia ovárica prematura, enfermedad pulmonar fibrótica, alveolitis fibrosante criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial post-inflamatoria, pneumonitis intersticial, enfermedad pulmonar intersticial asociada con enfermedades del tejido conectivo, enfermedad pulmonar asociada con enfermedades del tejido conectivo mixtas, enfermedad pulmonar intersticial asociada con esclerosis sistémica, enfermedad pulmonar intersticial asociada con artritis reumática, enfermedad pulmonar asociada con lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar asociada con dermatomiositis/polimiositis, enfermedad pulmonar asociada con la enfermedad de Sjogren, enfermedad pulmonar asociada con espondilitis anquilosante, enfermedad pulmonar difusa vasculítica, enfermedad pulmonar asociada con hemosiderosis, enfermedad pulmonar intersticial inducida por drogas, fibrosis, fibrosis por radiación, bronquiolitis obliterans, neumonía eosinofílica crónica, enfermedad pulmonar linfocítica infiltrante, enfermedad pulmonar intersticial postinfecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmune, hepatitis autoinmune tipo-1 (hepatitis autoinmune o lupoide clásica), hepatitis autoinmune tipo-2 (hepatitis por anticuerpo anti-LKM), hipoglucemia autoinmune, resistencia a insulina tipo B con acantosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad inmune aguda asociada con el transplante de órganos, enfermedad inmune crónica asociada con el

transplante de órganos, osteoartritis, colangitis esclerosante primaria, psoriasis tipo 1, psoriasis tipo 2, leucopenia idiopática, neutropenia autoinmune, enfermedad renal NOS, glomerulonefritis, vasculitis microscópica de los riñones, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso discoide, esterilidad masculina idiopática o NOS, autoinmunidad del espermatozoides, esclerosis múltiple (todos los subtipos), oftalmia simpática, hipertensión pulmonar secundaria a una enfermedad del tejido conectivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nodosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumática, enfermedad de Still, esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren, enfermedad/arteritis de Takayasu, trombocitopenia autoinmune, trombocitopenia idiopática, enfermedad tiroidea autoinmune, hipertiroidismo, hipotiroidismo autoinmune bocioso (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmune atrófico, mixedema primaria, uveítis facogénica, vasculitis primaria, vitiligo, enfermedad hepática aguda, enfermedad hepática crónica, cirrosis alcohólica, daño hepático inducido por alcohol, colestasis, enfermedad hepática idiosincrática, hepatitis inducida por drogas, esteatohepatitis no alcohólica, alergia, infección por estreptococos grupo B (GBS), trastornos mentales (por ejemplo, depresión y esquizofrenia), enfermedades mediadas por tipo Th2 y tipo Th1, dolor agudo y crónico (diferentes formas de dolor), distintos tipos de cáncer tales como cáncer de pulmón, mama, estómago, vejiga, colon, páncreas, ovario, próstata y rectal y formas malignas hematopoyéticas (leucemia y linfoma), abetalipoproteinemia, acrocianosis, procesos parasitarios o infecciosos agudos y crónicos, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), infección bacteriana

aguda o crónica, pancreatitis aguda, insuficiencia renal aguda, adenocarcinomas, latidos ectópicos atriales, complejo de demencia del SIDA, hepatitis inducida por alcohol, conjuntivitis alérgica, dermatitis por contacto alérgica, rinitis alérgica, rechazo a aloinjertos, déficit de alfa-1-antitripsina, esclerosis lateral amiotrófica, anemia, angina pectoris, degeneración de células del asta anterior, terapia anti-CD3, síndrome antifosfolípido, reacciones de hipersensibilidad anti-receptor, aneurismas aórticos y periféricos, disección aórtica, hipertensión arterial, arterioesclerosis, fístula arteriovenosa, ataxia, fibrilación auricular (sostenida o paroxística), taquicardia auricular, bloqueo aurículoventricular, linfoma de células B, rechazo de injerto óseo, rechazo de transplante de médula ósea (BMT), bloqueo de ramas de haz de His, linfoma de Burkitt, acidez estomacal, arritmias cardíacas, síndrome de *atontamiento* cardíaco, tumores cardíacos, cardiomiopatía, respuesta de inflamación a una derivación [*bypass*] cardiopulmonar, rechazo al transplante de cartílago, degeneraciones de la corteza del cerebelo, trastornos del cerebelo, taquicardia auricular caótica o multifocal, trastornos asociados con una quimioterapia, leucemia mielocítica crónica (CML), alcoholismo crónico, patologías inflamatorias crónicas, leucemia linfocítica crónica (CLL), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), intoxicación crónica por salicilato, carcinoma colorrectal, insuficiencia cardíaca congestiva, conjuntivitis, dermatitis por contacto, cor pulmonale, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, sepsis con cultivo negativo, fibrosis quística, trastornos asociados con una terapia con citoquinas, demencia pugilística, enfermedades desmielinizantes, fiebre hemorrágica del dengue, dermatitis, condiciones dermatológicas, diabetes,

enfermedad aterosclerótica diabética, enfermedad de cuerpos difusos de Lewy, cardiomiopatía congestiva dilatada, trastornos del ganglio basal, síndrome de Down en la edad madura, trastornos del movimiento inducidos por drogas que bloquean los receptores de dopamina del CNS, sensibilidad a drogas, eczema, encefalomiелitis, endocarditis, endocrinopatía, epiglotitis, infección por el virus Epstein-Barr, eritromelalgia, trastornos extrapiramidales y del cerebelo, linfohistiocitosis hematofagocítica familiar, rechazo al implante de timo fetal, ataxia de Friedreich, trastornos funcionales de las arterias periféricas, sepsis fúngicas, gangrena gaseosa, úlcera gástrica, nefritis glomerular, rechazo a injertos de cualquier órgano o tejido, sepsis Gram-negativa, sepsis Gram-positiva, granulomas debidos a organismos intracelulares, leucemia de células pilosas, enfermedad de Hallervorden-Spatz, tiroiditis de Hashimoto, fiebre del heno, rechazo al transplante de corazón, hemacromatosis, hemodiálisis, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombolítica, hemorragia, hepatitis A, arritmias del haz de His, infección por VIH/neuropatía por VIH, enfermedad de Hodgkin, trastornos de movimientos hiperquinéticos, reacciones de hipersensibilidad, pneumonitis por hipersensibilidad, hipertensión, trastornos de movimientos hipoquinéticos, evaluación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, enfermedad de Addison idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, citotoxicidad mediada por anticuerpos, astenia, atrofia muscular espinal infantil, inflamación de la aorta, influenza A, exposición a radiación ionizante, iridociclitis/uveítis/neuritis óptica, lesiones por reperfusión isquémica, accidente cerebrovascular isquémico, artritis reumática juvenil, atrofia muscular espinal juvenil, sarcoma de Kaposi,

rechazo al trasplante de riñón, legionella, leishmaniasis, lepra, lesiones del sistema corticoespinal, lipedema, rechazo al trasplante de hígado, linfedema, malaria, linfoma maligno, histiocitosis maligna, melanoma maligno, meningitis, meningococcemia, metabólica/idiopática, migraña cefalea, trastorno mitocondrial multisistémico, enfermedad del tejido conectivo mixto, gammopatía monoclonal, mieloma múltiple, degeneraciones de múltiples sistemas (Mencel, Dejerine-Thomas, Shi-Drager y Machado-Joseph), miastenia grave, *Mycobacterium avium intracellulare*, *Mycobacterium tuberculosis*, síndrome mielodiplástico, infarto de miocardio, trastornos isquémicos del miocardio, carcinoma nasofaríngeo, enfermedad pulmonar neonatal crónica, nefritis, nefrosis, enfermedades neurodegenerativas, atrofas musculares neurogénicas, fiebre neutropénica, linfoma no Hodgkins, oclusión de la aorta abdominal y sus ramas, trastornos arteriales oclusivos, terapia con OKT3®, orquitis/epididimitis, procedimientos de reversión de orquitis/vasectomía, organomegalia, osteoporosis, rechazo al trasplante de páncreas, carcinoma pancreático, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia maligna, rechazo al trasplante de paratiroides, enfermedad inflamatoria pélvica, rinitis perenne, enfermedad del pericardio, enfermedad aterosclerótica periférica, trastornos vasculares periféricos, peritonitis, anemia perniciosa, neumonía por *Pneumocystis carinii*, neumonía, síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammopatía monoclonal y síndrome de cambios de piel), síndrome de post-perfusión, síndrome postbomba, síndrome de cardiectomía post-MI, preeclampsia, parálisis supranuclear progresiva, hipertensión pulmonar primaria, terapia de radiación,

fenómeno de Raynaud, enfermedad de Raynaud, enfermedad de Refsum, taquicardia por QRS estrecho regular, hipertensión renovascular, lesión por reperfusión, cardiomiopatía restrictiva, sarcomas, corea senil, demencia senil de tipo cuerpo de Lewy, artropatías seronegativas, shock, anemia de células falsiformes, rechazo de aloinjertos de piel, síndrome de cambios de piel, rechazo al trasplante de intestino delgado, tumores sólidos, arritmias específicas, ataxia espinal, degeneraciones espinocerebelosas, miositis estreptococcica, lesiones estructurales del cerebelo, panencefalitis esclerosante subaguda, síncope, sífilis del sistema cardiovascular, anafilaxia sistémica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, artritis reumática juvenil de comienzo sistémico, ALL por células T o FAB, telangiectasia, tromboangitis obliterans, trombocitopenia, toxicidad, trasplantes, traumatismo/hemorragia, reacciones de hipersensibilidad tipo III, hipersensibilidad de tipo IV, angina inestable, uremia, urosepsis, urticaria, enfermedades de las válvulas cardíacas, venas varicosas, vasculitis, enfermedades venosas, trombosis venosa, fibrilación ventricular, infecciones virales y fúngicas, encefalitis viral/meningitis aséptica, síndrome hemafagocítico asociado a virus, síndrome de Wernicke-Korsakoff, síndrome de Wilson, rechazo a xenoinjertos de cualquier órgano o tejido, síndromes coronarios agudos, polineuritis idiopática aguda, polirradiculopatía inflamatoria desmielinizante aguda, isquemia aguda, enfermedad de Still del adulto, *Alopecia areata*, anafilaxis, síndrome de anticuerpo antifosfolípido, anemia aplásica, arteriosclerosis, eczema atópico, dermatitis atópica, dermatitis autoinmune, trastorno autoinmune asociado con una infección por estreptococo, enteropatía autoinmune, síndrome de pérdida

de la audición autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS), miocarditis autoinmune, insuficiencia ovárica prematura autoinmune, blefaritis, bronquiectasias, penfigoide bulloso, enfermedad cardiovascular, síndrome antifosfolípido catastrófico, enfermedad celíaca, espondilosis cervical, isquemia crónica, penfigoide cicatricial, síndrome clínicamente aislado (CIS) con riesgo de esclerosis múltiple, conjuntivitis, trastorno psiquiátrico en la niñez, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), dacriocistitis, dermatomiositis, retinopatía diabética, hernia de disco, prolapso de disco, anemia hemolítica inmune inducida por drogas, endocarditis, endometriosis, endoftalmitis, episcleritis, eritema multiforme, eritema multiforme mayor, penfigoide gestacional, síndrome de Guillain-Barre (GBS), fiebre del heno, síndrome de Hughes, enfermedad de Parkinson idiopática, neumonía intersticial idiopática, alergia mediada por IgE, anemia hemolítica inmune, miositis por cuerpos de inclusión, enfermedad inflamatoria infecciosa ocular, enfermedad inflamatoria desmielinizante, enfermedad inflamatoria del corazón, enfermedad inflamatoria del riñón, IPF/UIP, iritis, queratitis, queratoconjuntivitis seca, enfermedad de Kussmaul o enfermedad de Kussmaul-Meier, parálisis de Landry, histiocitosis de las células de Langerhans, *Livido reticularis*, poliangitis microscópica con degeneración macular, morbus Bechterev, trastorno neuronal motor, penfigoide de la membrana mucosa, insuficiencia multiorgánica, miastenia gravis, síndrome mielodisplásico, miocarditis, trastornos de las raíces nerviosas, neuropatía, hepatitis no-A no-B, neuritis óptica, osteolisis, cáncer de ovario, JRA pauciarticular, enfermedad oclusiva arterial periférica (PAOD), enfermedad vascular periférica (PVD),

enfermedad arterial periférica (PAD), flebitis, poliarteritis nodosa (o periarteritis nodosa), policondritis, polimialgia reumática, poliosis, JRA Poliarticular, síndrome de deficiencia poliendócrina, polimiositis, polimialgia reumática (PMR), síndrome de post-bomba, parkinsonismo primario, cáncer de próstata y rectal y formas malignas hematopoyéticas (leucemia y linfoma), prostatitis, aplasia de glóbulos rojos pura, insuficiencia adrenal primaria, neuromielitis óptica recurrente, restenosis, enfermedad del corazón reumático, SAPHO (sinovitis, acne, pustulosis, hiperostosis y osteitis), amiloidosis secundaria, pulmón de shock, escleritis, ciática, insuficiencia adrenal secundaria, enfermedad del tejido conectivo asociada a siliconas, dermatosis de Sneddon-Wilkinson, espondilitis anquilosante, síndrome de Stevens-Johnson (SJS), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, arteritis temporal, retinitis toxoplásmica, necrólisis epidérmica tóxica, mielitis transversa, TRAPS (síndrome periódico asociado al receptor del factor de necrosis tumoral), reacción alérgica de Tipo 1, diabetes de Tipo II, urticaria, neumonía intersticial usual (UIP), vasculitis, conjuntivitis vernal, retinitis viral, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (síndrome VKH), degeneración macular húmeda y cicatrización de heridas.

34. El método para tratar el dolor en un individuo de acuerdo con la reivindicación 17, CARACTERIZADO PORQUE el individuo sufre de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en un cáncer primario, un cáncer metastásico, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de pulmón, cáncer orofaríngeo, cáncer hipofaríngeo, cáncer de esófago, cáncer de

estómago, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de vesícula, cáncer de los ductos biliares, cáncer de intestino delgado, cáncer de colon, cáncer del tracto urinario, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer del urotelio, cáncer del tracto genital femenino, cáncer cervical, cáncer de útero, cáncer de ovario, coriocarcinoma, enfermedad trofoblástica gestacional, cáncer del tracto genital masculino, cáncer de próstata, cáncer de vesículas seminales, cáncer de testículo, tumor de células germinales, cáncer de glándula glándulas endócrinas, cáncer de tiroides, cáncer adrenal, cáncer de la glándula pituitaria , cáncer de piel, hemangioma, melanoma, sarcoma, cáncer de hueso, cáncer de tejidos blandos, sarcoma de Kaposi, tumor de cerebro, cáncer de nervios, cáncer de los ojos, cáncer de las meninges, astrocitoma, glioma, glioblastoma, retinoblastoma, neuroma, neuroblastoma, Schwannoma, meningioma, un tumor sólido que surge de una forma maligna hematopoyética, leucemia, linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin.

35. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17-28 y 31-34, CARACTERIZADO PORQUE dicho paso de administración a dicho sujeto es mediante por lo menos un modo seleccionado entre parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intraventricular, intracerebeloso, intracerebroventricular, intracolónico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraóseo, intrapélvico, intrapericardíaco, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal,

intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterino, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal y transdérmico.

 SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 27-08-13 (30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País 61/440,853 08-02-11 US	(51) Int Cl: A61K 39/395 (71) Solicitante(s): ABBVIE, INC. (72) Inventor(es): KAMATH, Rajesh, V. (74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 08-09-13 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 08-02-12 No. de solicitud: PCT/US2012/024356	(87) Publicación internacional Fecha: 16-08-12 No. publicación: WO 2012/109373 A3
(54) Título: “TRATAMIENTO DE LA OSTEOARTRITIS Y DEL DOLOR”	

Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-

Tratamiento de la osteoartritis y del dolor usando proteínas de unión a IL-1α e IL-1β, incluyendo anticuerpos anti-IL-1α y anti-IL-1β y proteínas de unión IL-1α e IL-1β manipuladas multivalentes y de especificidad múltiple.

Sector: Preparaciones que comprenden proteínas de unión a IL-1α e IL-1β, incluyendo anticuerpos anti-IL-1α y anti-IL-1β y proteínas de unión IL-1α e IL-1β manipuladas multivalentes y de especificidad múltiple utiles en el tratamiento de tratar la osteoartritis (OA) y para tratar el dolor.

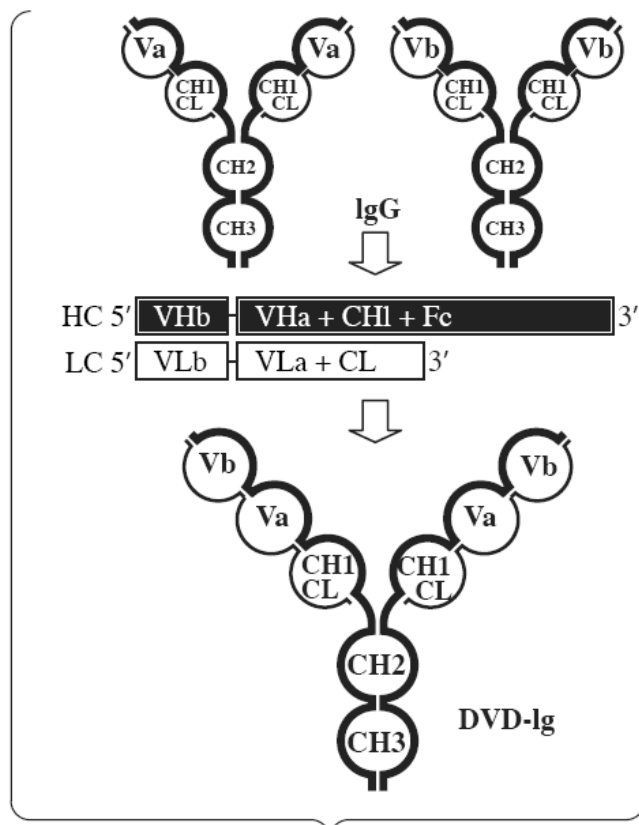


FIGURA 1A

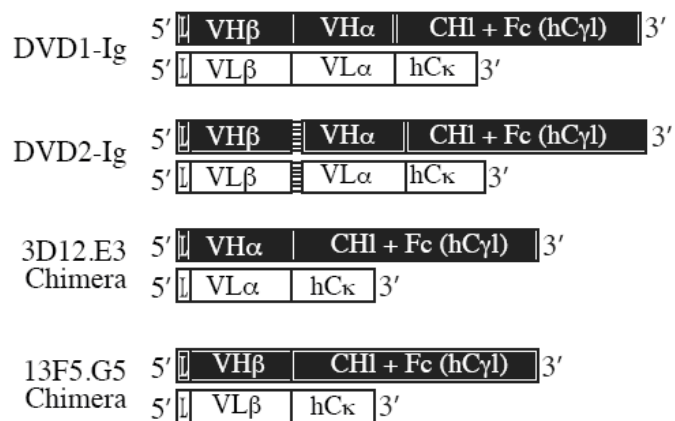


FIGURA 1B

Degeneración de cartilago por zonas: medial de la tibia

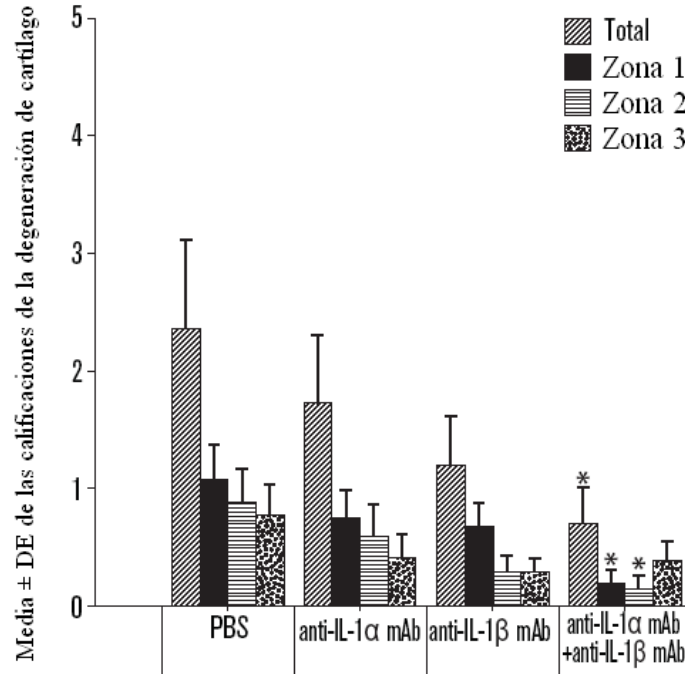


FIGURA 2

Degeneración de cartilago por zonas: medial de la tibia

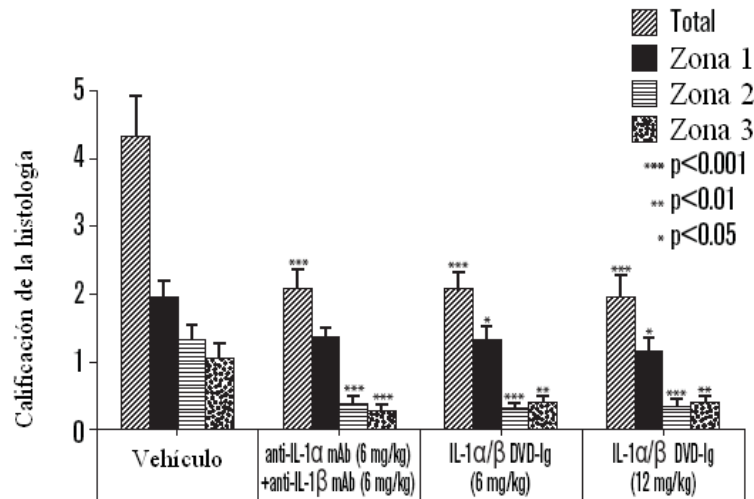


FIGURA 3

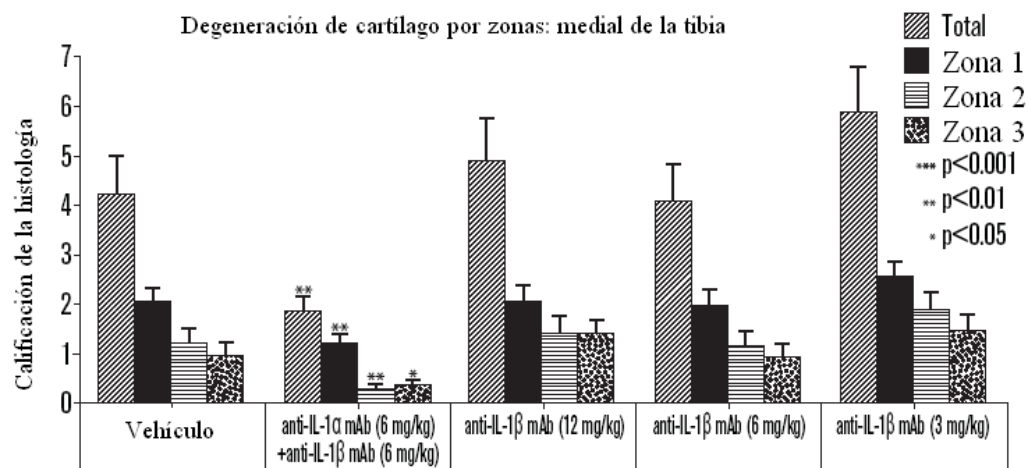


FIGURA 4

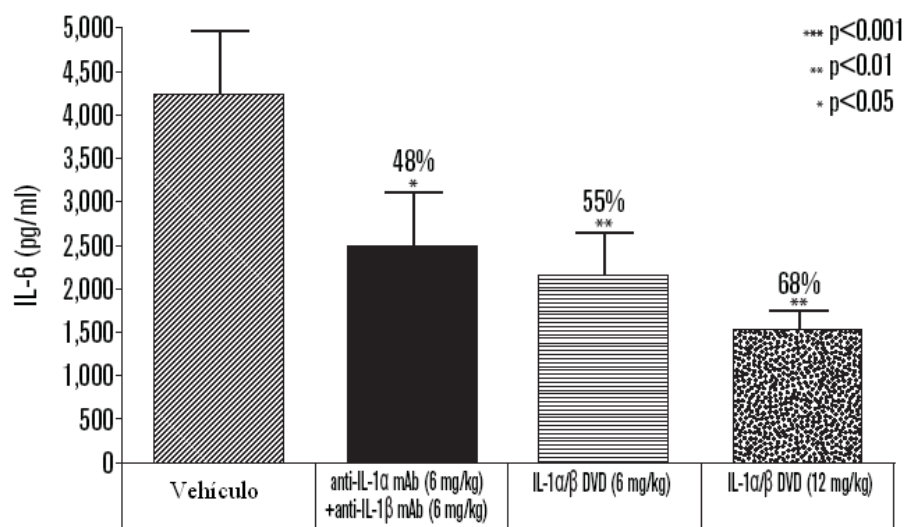


FIGURA 5

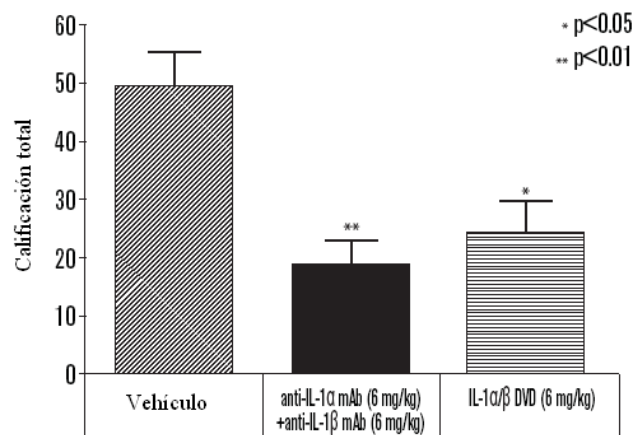


FIGURA 6

El tratamiento con una combinación de mAbs anti-IL-1 α/β o con DVD-Ig IL-1 α/β inhibe la degradación del cartilago

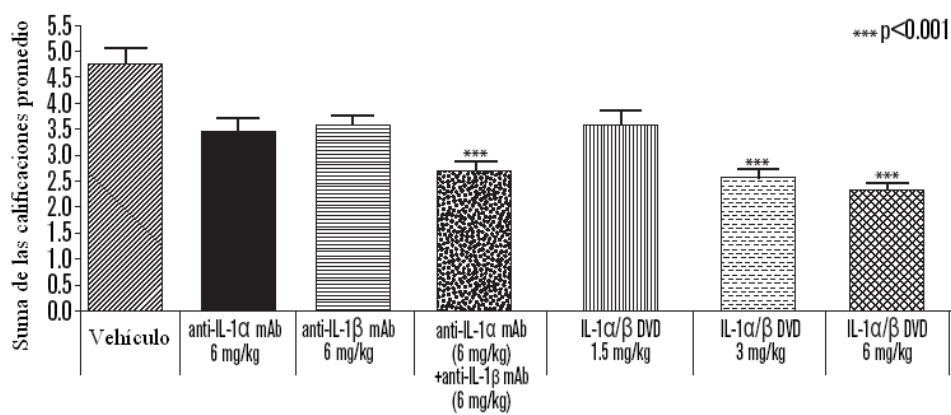


FIGURA 7

El tratamiento con una combinación de mAbs anti-IL-1 α/β o con Doxiciclina inhibe la degradación del cartilago

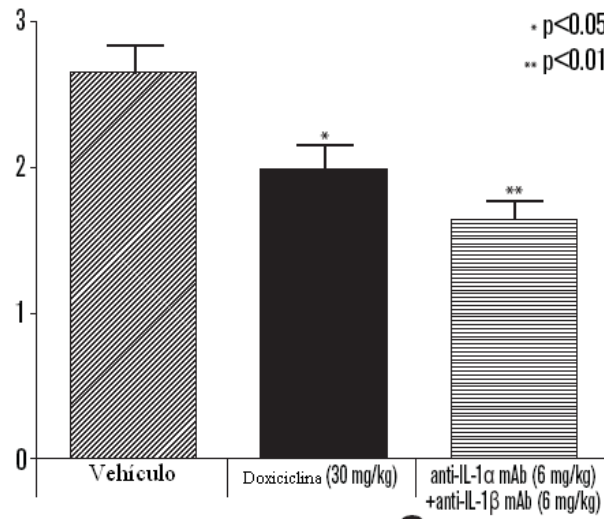


FIGURA 8

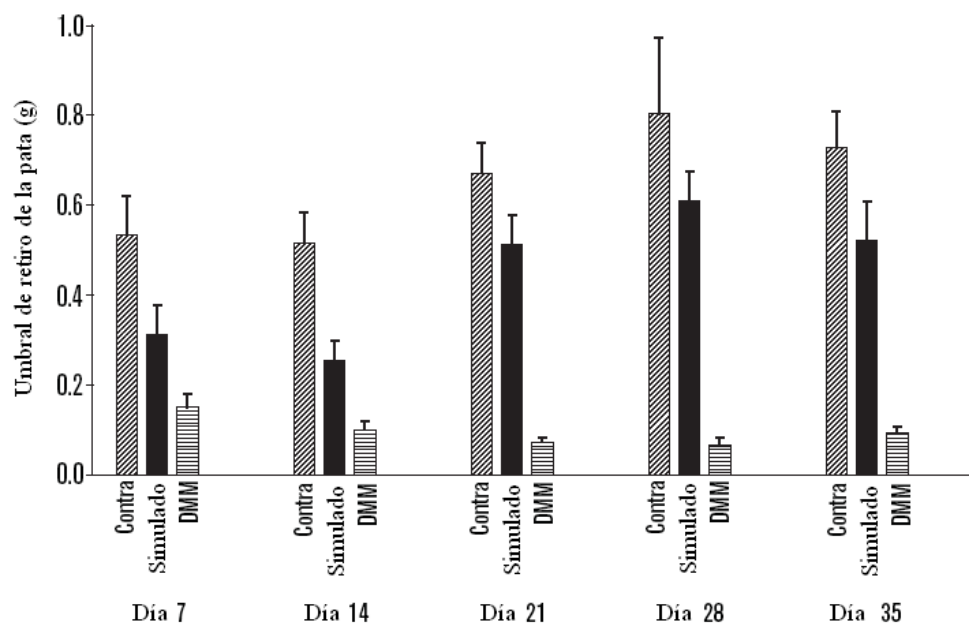


FIGURA 9

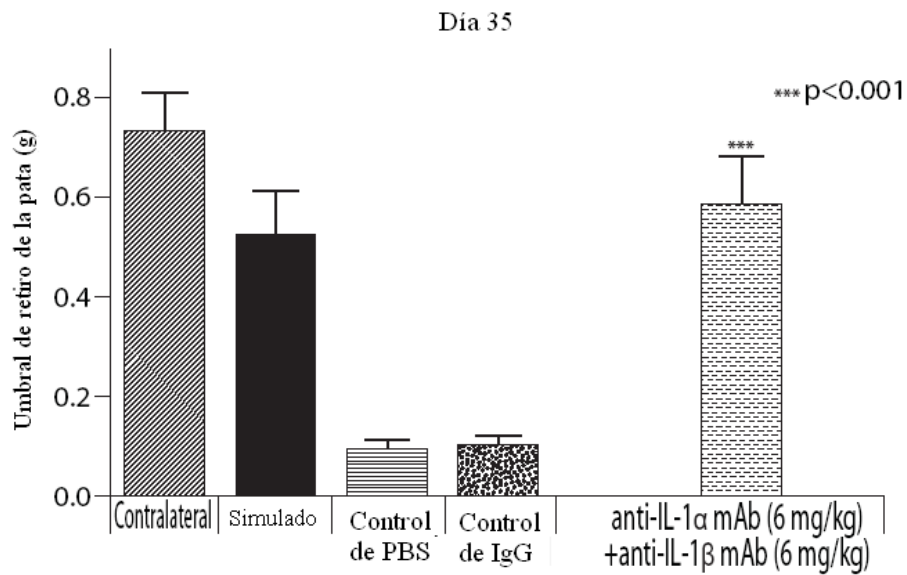


FIGURA 10

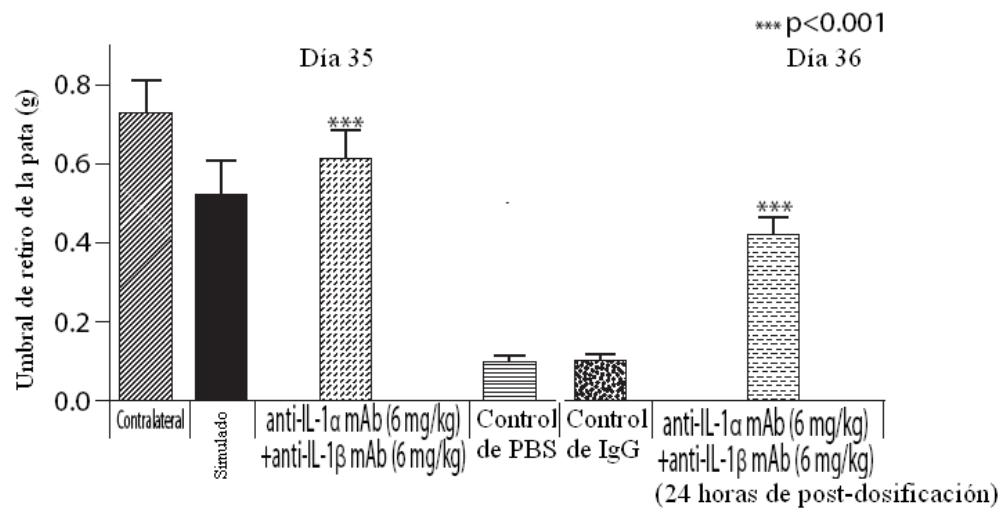


FIGURA 11

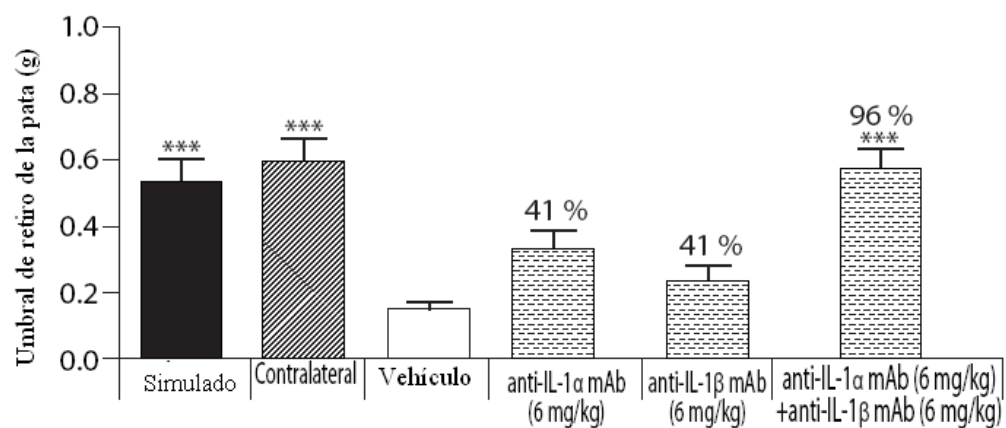


FIGURA 12

Efectos analgésicos de una combinación de mAbs anti-IL-1 α/β en el Modelo con desestabilización del menisco medial

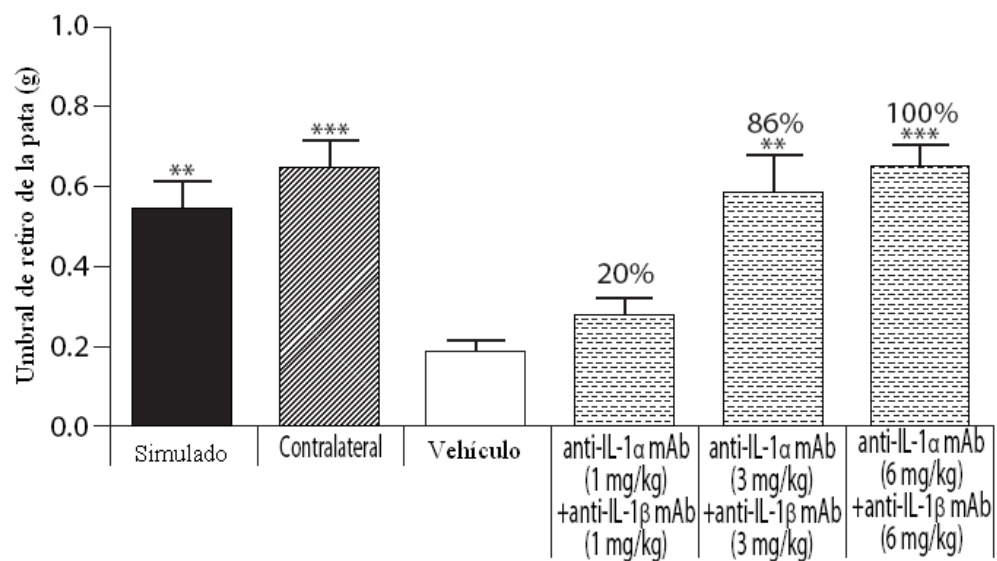


FIGURA 13

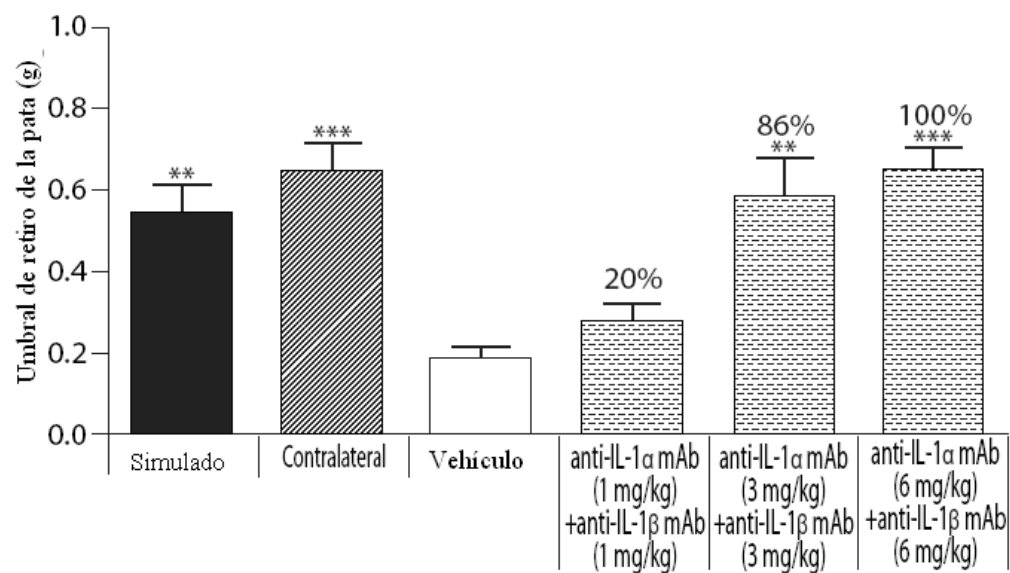


FIGURA 14

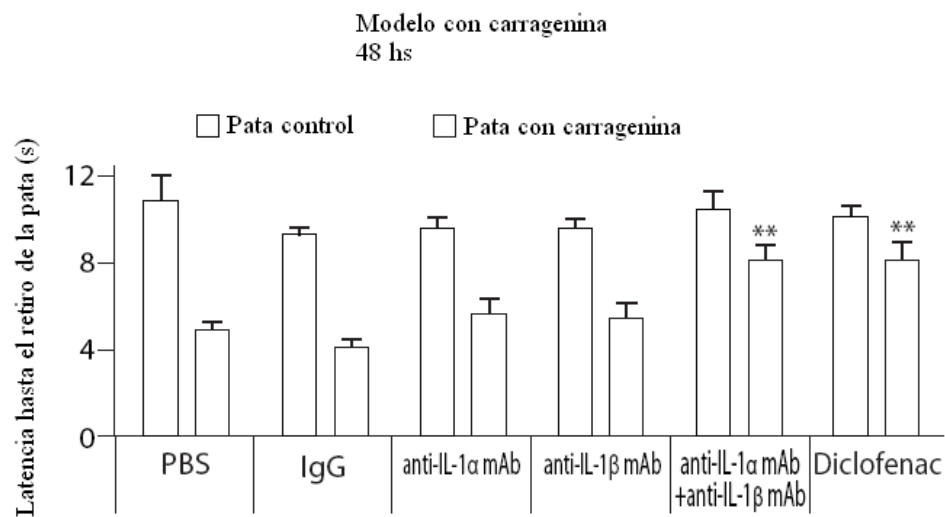


FIGURA 15A

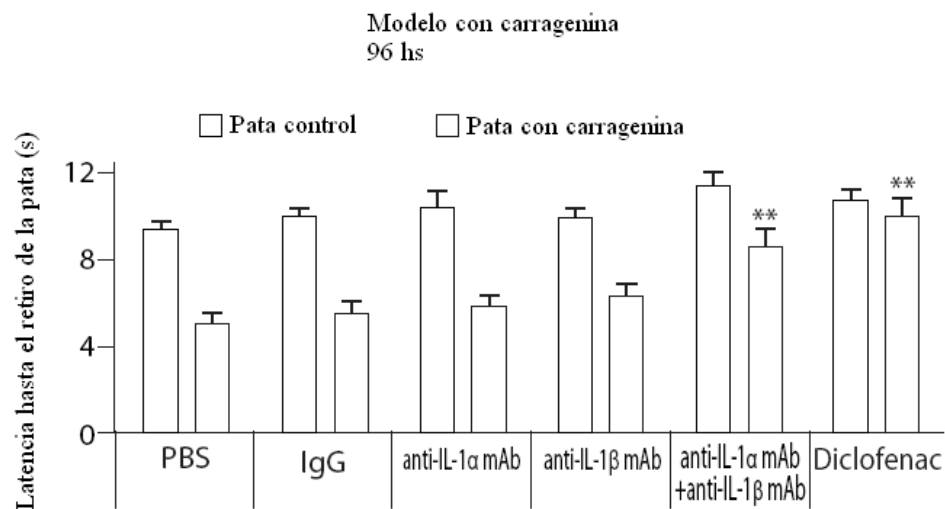


FIGURA 15B

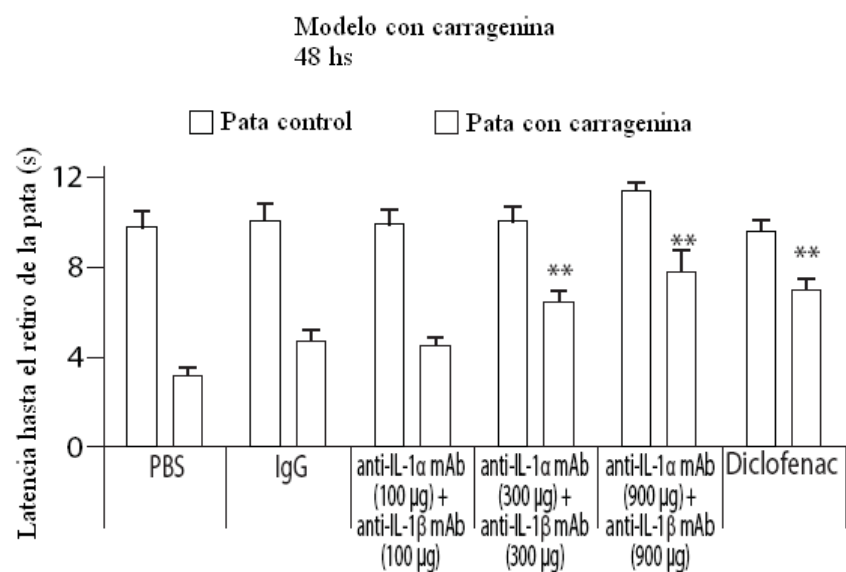


FIGURA 16A

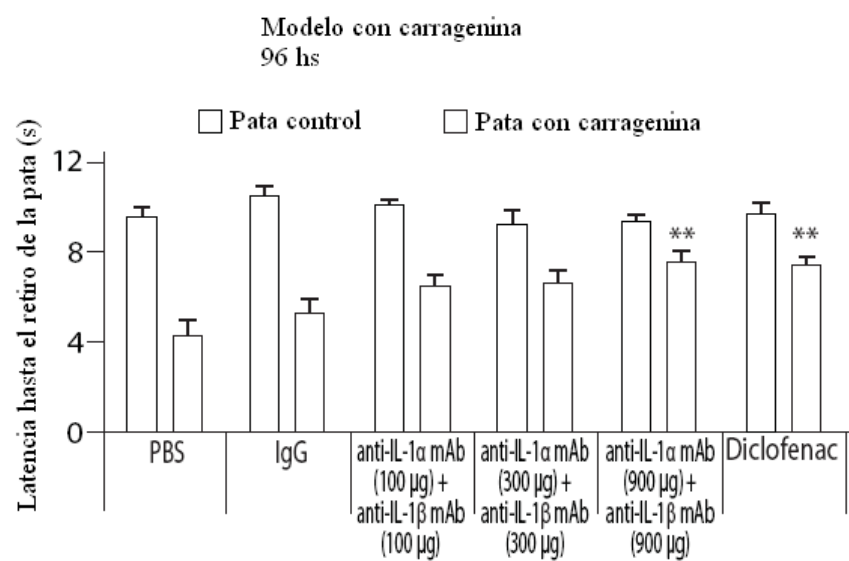


FIGURA 16B

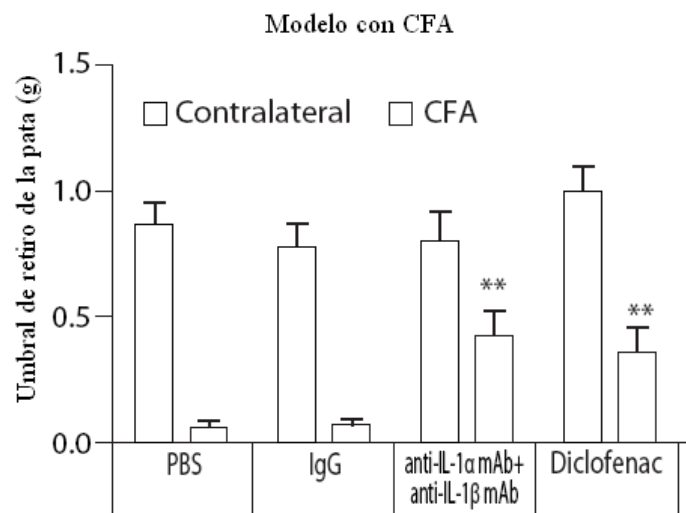


FIGURA 17A

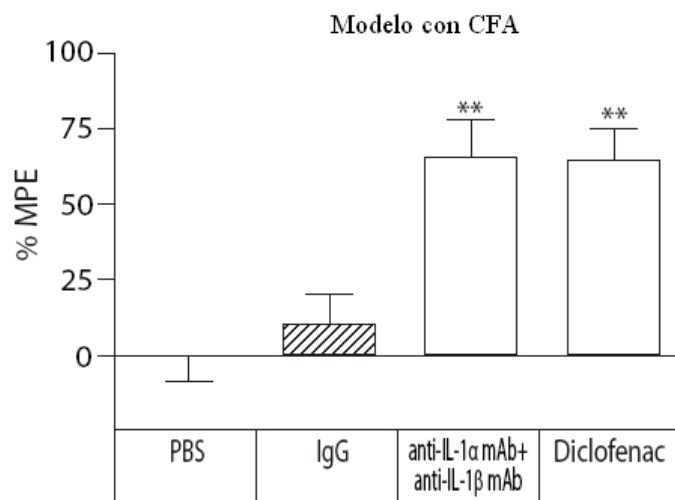


FIGURA 17B

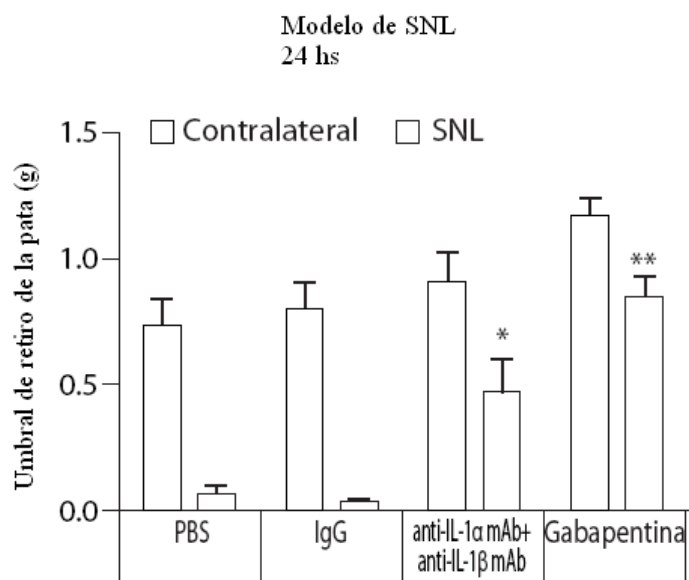


FIGURA 18A

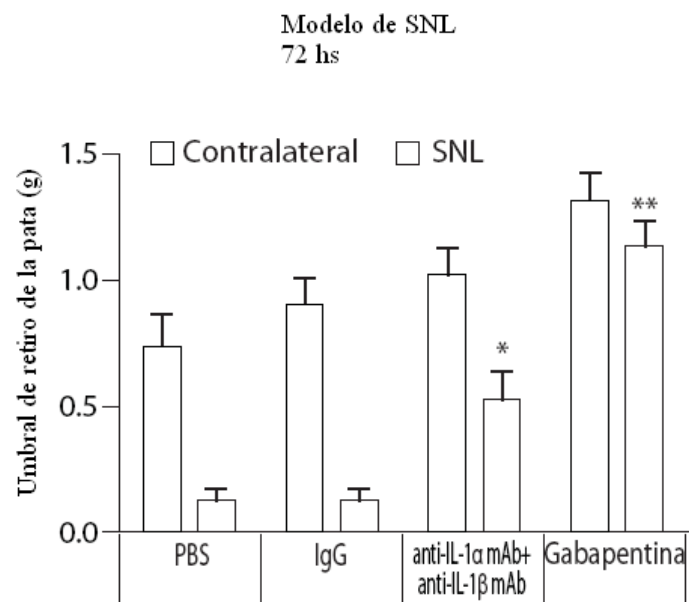


FIGURA 18B

Efectos del tratamiento con una combinación de mAb anti-IL-1 α y mAb anti-IL-1 β en el modelo de SNL

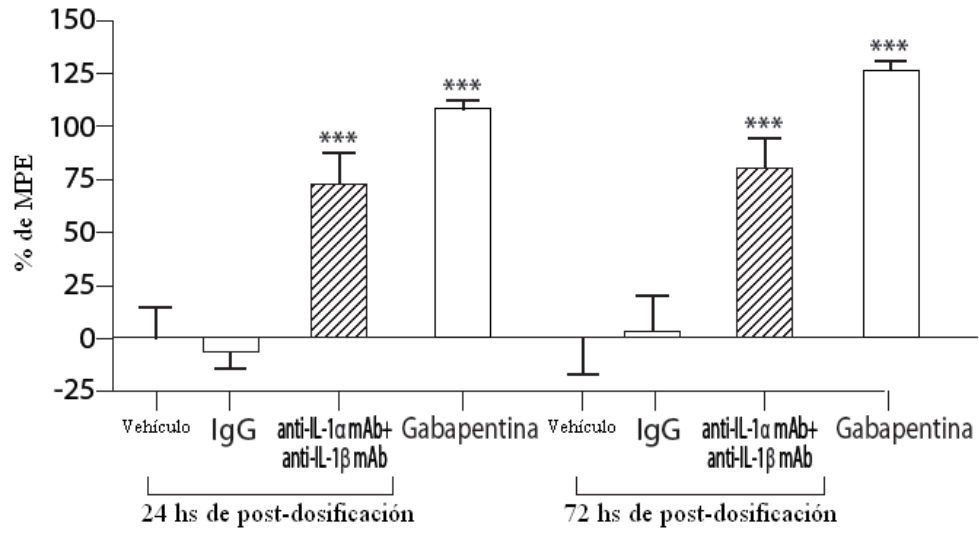


FIGURA 19

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

YANKWICH, Leon, R.
Yankwich & Associates, P.C.
201 Broadway
Cambridge, MA 02139
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 02 April 2013 (02.04.2013)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference ABT-122.1PCT	
International application No. PCT/US2012/024356	International filing date (day/month/year) 08 February 2012 (08.02.2012)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address ABBOTT LABORATORIES 100 Abbott Park Road Abbott Park, IL 60064 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No. 847-937-5714	
	Facsimile No. 847-938-2923	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address ABBVIE INC. 1 North Waukegan Road North Chicago, IL 60064 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:	☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the receiving Office	☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority	☒ the elected Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Kobayashi Miki e-mail pt08.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 08
---	---

Facsimile No. +41 22 338 70 10

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:
LEON R. YANKWICH
YANKWICH & ASSOCIATES, P.C.
201 BROADWAY
CAMBRIDGE, MA 02139
USA

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year)

14 MAR 2013

Applicant's or agent's file reference

ABT-122.1 PCT (10918)

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/US12/24356

International filing date (day/month/year)

08 February 2012 (08.02.2012)

Priority date (day/month/year)

08 February 2011 (08.02.2011)

Applicant

ABBOTT LABORATORIES

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
4. **REMINDER**

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices)(Article 39(1))(see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the *PCT Applicant's Guide*.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed invention is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the IPEA/ US

Mail Stop PCT, Attn: IPEA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (571) 273-3201

Authorized officer

Prema Mertz

Telephone No. 571-272-0876

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference ABT-122.1 PCT (10918)	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/IPEA/416
International application No. PCT/US12/24356	International filing date (day/month/year) 08 February 2012 (08.02.2012)	Priority date (day/month/year) 08 February 2011 (08.02.2011)	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC IPC: A61K 39/395 (2006.01); C07K 16/00 (2006.01) USPC: 424/158.1;530/388.23			
Applicant ABBOTT LABORATORIES			
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ (sent to the applicant and to the International Bureau) a total of <u>0</u> sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority, unless those sheets were superseded or cancelled, and any accompanying letters (see Rules 46.5, 66.8, 70.16, 91.2, and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets containing rectifications, where the decision was made by this Authority not to take them into account because they were not authorized by or notified to this Authority at the time when this Authority began to draw up this report, and any accompanying letters (Rules 66.4bis, 70.2(e), 70.16 and 91.2). ☐ superseded sheets and any accompanying letters, where this Authority either considers that the superseding sheets contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, or the superseding sheets were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in item 4 of Box No.I and the Supplemental Box (see Rule 70.16(b)). b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) _____ containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3bis of Annex C of the Administrative Instructions).			
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 10 September 2012 (18.09.2012)		Date of completion of this report 06 March 2013 (06.03.2013)	
Name and mailing address of the IPEA/ US Mail Stop PCT, Attn: IPEA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Gary Nickol Telephone No. 571-272-0700	

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/US12/24356

Box No. I Basis of the report1. With regard to the **language**, this report is based on:

- ☒ the international application in the language in which it was filed.
- ☐ a translation of the international application into English which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).
- ☐ publication of the international application (Rule 12.4(a)).
- ☐ international preliminary examination (Rules 55.2(a) and/or 55.3(a) and (b)).

2. With regard to the **elements** of the international application, this report is based on (*replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report*):

- ☒ the international application as originally filed/furnished
- ☒ the description:
 pages 1-117 as originally filed/furnished
 pages* NONE received by this Authority on _____
 pages* NONE received by this Authority on _____
- ☒ the claims:
 pages 118-127 as originally filed/furnished
 pages* NONE as amended (together with any statement) under Article 19
 pages* NONE received by this Authority on _____
 pages* NONE received by this Authority on _____
- ☒ the drawings:
 pages 1/13-13/13 as originally filed/furnished
 pages* NONE received by this Authority on _____
 pages* NONE received by this Authority on _____

☐ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/figs _____
- ☐ the sequence listing (*specify*): _____

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (c-bis)):

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/figs _____
- ☐ the sequence listing (*specify*): _____

5. ☐ This report has been established:

- ☐ taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.1(d-bis) and 70.2(e)).
- ☐ without taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.4bis) and 70.2(e)).

6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) _____ has/have been received and taken into account in establishing this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

* If item 4 applies, some or all of those sheets may be marked "superseded."

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US12/24356**Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty (N)	Claims <u>6, 8, 10, 12-16</u>	YES
	Claims <u>1-4</u>	NO
Inventive Step (IS)	Claims <u>NONE</u>	YES
	Claims <u>1-4, 6, 8, 10, 12-16</u>	NO
Industrial Applicability (IA)	Claims <u>1-4, 6, 8, 10, 12-16</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO

2. Citations and Explanations (Rule 70.7)
Please See Continuation Sheet

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US12/24356

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.
Continuation of:

V. 2. Citations and Explanations:

Claims 1-4 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by an article titled "IL-1 alpha/beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation" by Joosten, et al. (hereinafter "Joosten").

As to claims 1-4, Joosten discloses a method for treating osteoarthritis in an individual (defined by Applicant as human or other mammal, see pg 4, In 16-17) comprising the step of administering to the individual a binding protein that binds IL-1alpha and a binding protein that binds IL-1beta (Abstract, an "anti-IL-1 treatment ameliorated disease activity when applied shortly after onset of CIA [collagen-induced arthritis] anti-IL-1 treatment of established CIA normalized COMP levels, apparently alleviating the process in the tissue. Histology of knee and ankle joints corroborated the finding and showed that cartilage and joint destruction was significantly decreased after anti-IL-1 treatment... Radiographic analysis of knee and ankle joints revealed that bone erosions were prevented by anti-IL-1 treatment... metalloproteinase activity, visualized by VDIPEN production, was almost absent throughout the cartilage layers in anti-IL-1-treated animals... These results indicate that blocking of IL-1 is a cartilage- and bone-protective therapy in destructive arthritis..") and further specifically discloses anti-IL-1a and IL-1b antibody (pg 5050, col 1, "[t]o eliminate IL-1a/lb, mice received one single injection of purified (IgG fraction) rabbit anti-murine IL-1a and anti-IL-1b (1 mg of each Ig)").

Claim 16 lacks an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Joosten, as above.

As to claim 16, Joosten discloses that "[t]o eliminate IL-1alb, mice received one single injection of purified (IgG fraction) rabbit anti-murine IL-1a and anti-IL-1b (1 mg of each Ig). This dose revealed to be sufficient to suppress several murine arthritis models such as Ag-induced arthritis, immune complex-induced arthritis, and CIA" (pg 5050, col 1), but does not disclose a specific mode of administering said antibodies. It would have been obvious to one of ordinary skill in the art how to, in the course of routine experimentation and with a reasonable expectation of success select an optimal route of administration of said antibodies.

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US12/24356

Supplemental Box

Claims 6, 8, 10, 12-15 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Joosten, as above, in view of US 2011/0008766 A1 to Ghayur, et al. (hereinafter "Ghayur").

As to claims 6, 10 and 12, Joosten does not teach that said binding protein that binds IL-1a and said binding protein that binds IL-1b are formulated in a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier. Ghayur discloses "a formulation that ... comprises a crystallized binding protein..., and an ingredient, and at least one polymeric carrier. For example, the polymeric carrier comprises one or more polymers selected from the group consisting of: poly (acrylic acid), poly (cyanoacrylates), poly (amino acids), poly (anhydrides), poly (depsipeptide), poly (esters), poly (lactic acid), poly (lactic-co-glycolic acid) or PLGA, poly (b-hydroxybutyrate), poly (caprolactone), poly (dioxanone), poly (ethylene glycol), poly ((hydroxypropyl) methacrylamide, poly [(organo)phosphazene], poly (ortho esters), poly (vinyl alcohol), poly (vinylpyrrolidone), maleic anhydride-alkyl vinyl ether copolymers, pluronic polyols, albumin, alginate, cellulose and cellulose derivatives, collagen, fibrin, gelatin, hyaluronic acid, oligosaccharides, glycaminoglycans, sulfated polysaccharides, blends and copolymers thereof (para [0058]). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to combine Joosten and Ghayur by formulating, in the course of routine experimentation and with a reasonable expectation of success, a pharmaceutical composition comprising a suitable polymeric pharmaceutically acceptable carrier among those disclosed by Ghayur, to achieve an optimal response from a patient upon administering the composition at issue.

As to claim 8, Joosten does not teach that said binding protein that binds IL-1a and said binding protein that binds IL-1b are crystallized. Ghayur discloses "a crystallized binding protein and exists as a crystal. In an embodiment the crystal is a carrier-free pharmaceutical controlled release crystal" (para [0053]). One of ordinary skill in the art would have been motivated to combine Joosten and Ghayur by crystallizing, in the course of routine experimentation and with a reasonable expectation of success, the anti- IL-1a and anti-IL-1b antibody of Joosten, such as to formulate a carrier-free pharmaceutical controlled release crystal, as in Ghayur, because Ghayur further teaches that "the crystallized binding protein has a greater half life in vivo than the soluble counterpart of said binding protein" (para [0053], see also para [0116], [0245]).

As to claim 13, Joosten does not teach that said ingredient is selected from the group consisting of albumin, sucrose, trehalose, lactitol, gelatin, hydroxypropyl-beta-cyclodextrin, methoxypolyethylene glycol and polyethylene glycol. This limitation is taught by Ghayur (para [0058]). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to combine Joosten and Ghayur by formulating, in the course of routine experimentation and with a reasonable expectation of success, a pharmaceutical composition comprising a suitable pharmaceutically ingredient among those disclosed by Ghayur, to achieve an optimal response from a patient upon administering the composition at issue (see Ghayur, para [0301], "[t]he compositions..., may contain formulatory agents, such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents").

As to claims 14 and 15, Joosten does not teach administering to the individual a second agent that provides a desirable property. This limitation is taught by Ghayur (para [0059]). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to combine Joosten and Ghayur by formulating, in the course of routine experimentation and with a reasonable expectation of success, a pharmaceutical composition comprising a suitable second agent that provides a desirable property based on the disclosure of Ghayur, to achieve an optimal response from a patient upon administering the composition at issue.

Claims 1-4, 6, 8, 10, 12-16 have industrial applicability as defined by PCT Article 33(4) because the subject matter can be made or used in industry.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Abbott Laboratories
KAMATH, Rajesh V.

<120> TRATAMIENTO DE LA OSTEOARTRITIS Y DEL DOLOR

<130> ABT-122.1 PCT (10918WOO1)

<140> PCT/US2012/024356

<141> 2012-02-08

<150> US 61/440,853

<151> 2011-02-08

<160> 151

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 271

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Met	Ala	Lys	Val	Pro	Asp	Met	Phe	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Cys	Tyr	Ser
1				5					10					15	

Glu	Asn	Glu	Glu	Asp	Ser	Ser	Ser	Ile	Asp	His	Leu	Ser	Leu	Asn	Gln
		20						25					30		

Lys	Ser	Phe	Tyr	His	Val	Ser	Tyr	Gly	Pro	Leu	His	Glu	Gly	Cys	Met
		35					40					45			

Asp	Gln	Ser	Val	Ser	Leu	Ser	Ile	Ser	Glu	Thr	Ser	Lys	Thr	Ser	Lys
50						55					60				

Leu	Thr	Phe	Lys	Glu	Ser	Met	Val	Val	Val	Ala	Thr	Asn	Gly	Lys	Val
65					70					75					80

Leu	Lys	Lys	Arg	Arg	Leu	Ser	Leu	Ser	Gln	Ser	Ile	Thr	Asp	Asp	Asp
				85					90					95	

Leu	Glu	Ala	Ile	Ala	Asn	Asp	Ser	Glu	Glu	Glu	Ile	Ile	Lys	Pro	Arg
			100					105					110		

Ser	Ala	Pro	Phe	Ser	Phe	Leu	Ser	Asn	Val	Lys	Tyr	Asn	Phe	Met	Arg
			115					120					125		

Ile Ile Lys Tyr Glu Phe Ile Leu Asn Asp Ala Leu Asn Gln Ser Ile
 130 135 140

Ile Arg Ala Asn Asp Gln Tyr Leu Thr Ala Ala Ala Leu His Asn Leu
 145 150 155 160

Asp Glu Ala Val Lys Phe Asp Met Gly Ala Tyr Lys Ser Ser Lys Asp
 165 170 175

Asp Ala Lys Ile Thr Val Ile Leu Arg Ile Ser Lys Thr Gln Leu Tyr
 180 185 190

Val Thr Ala Gln Asp Glu Asp Gln Pro Val Leu Leu Lys Glu Met Pro
 195 200 205

Glu Ile Pro Lys Thr Ile Thr Gly Ser Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe
 210 215 220

Trp Glu Thr His Gly Thr Lys Asn Tyr Phe Thr Ser Val Ala His Pro
 225 230 235 240

Asn Leu Phe Ile Ala Thr Lys Gln Asp Tyr Trp Val Cys Leu Ala Gly
 245 250 255

Gly Pro Pro Ser Ile Thr Asp Phe Gln Ile Leu Glu Asn Gln Ala
 260 265 270

<210> 2

<211> 153

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Ala Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp Ser Gln Gln Lys
 1 5 10 15

Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu His Leu Gln
 20 25 30

Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe Val Gln
 35 40 45

Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Leu Lys Glu
 50 55 60

Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro Thr Leu
 65 70 75 80

Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys Met Glu
 85 90 95

Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn Lys Leu Glu Phe
 100 105 110

Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Ala Glu
 115 120 125

Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly Gln Asp Ile Thr
 130 135 140

Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser
 145 150

<210> 3
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Phe Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210>	4
<211>	330
<212>	PRT
<213>	<i>Homo sapiens</i>

<400> 4

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

	180		185		190	
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
	195					Lys
						200
						Glu
						Tyr
						Lys
						Cys
						Lys
						205
						Val
						Ser
						Asn
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
	210					215
						Glu
						Lys
						Thr
						Ile
						Ser
						220
						Lys
						Ala
						Lys
						Gly
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
225					230	
						Tyr
						Thr
						Leu
						Pro
						235
						Pro
						Ser
						Arg
						Glu
						240
						Glu
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
				245		
						Leu
						Thr
						Cys
						250
						Leu
						Val
						Lys
						Gly
						Phe
						255
						Tyr
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
			260			
						Trp
						Glu
						265
						Ser
						Asn
						Gly
						Gln
						270
						Pro
						Glu
						Asn
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
		275				280
						Val
						Leu
						Asp
						Ser
						Asp
						Gly
						285
						Ser
						Phe
						Phe
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
290						295
						Asp
						Lys
						Ser
						Arg
						Trp
						300
						Gln
						Gln
						Gly
						Asn
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
305					310	
						His
						Glu
						Ala
						Leu
						315
						His
						Asn
						His
						Tyr
						Thr
						320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
						325
						Pro
						Gly
						Lys
						330
<210>	5					
<211>	106					
<212>	PRT					
<213>	<i>Homo sapiens</i>					
<400>	5					
Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val
1				5		
						Phe
						Ile
						Phe
						10
						Pro
						Pro
						Ser
						Asp
						Glu
						15
						Gln
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser
			20			
						Val
						Val
						25
						Cys
						Leu
						Leu
						Asn
						30
						Asn
						Phe
						Tyr
Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln
		35				
						Trp
						Lys
						Val
						Asp
						Asn
						Ala
						Leu
						Gln
						Ser
						45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 6
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

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

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 7
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> CARACT_MISC
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 7

Phe Gly Xaa Gly
 1

<210> 8
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5

<210> 9
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

Trp Gly Trp Gly
 1

<210> 10
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

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

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

<210> 11
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 16

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

Met	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

<210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 17

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

<210> 18
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 18

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

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

<210> 19
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 19

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

<210> 20
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 20

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

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

<210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 21

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

<210> 22
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 22

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

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

<210> 23
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 23

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

<210> 24
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 24

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

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

20

25

30

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

<400> 25

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

<210> 26
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 26

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser
 20 25 30

<210> 27
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 27

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

<210> 28
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 28

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

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

<210> 29
 <211> 11

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 29

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

<210> 30
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 30

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30

<210> 31
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 31

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

<210> 32
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 32

Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

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

<210> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 33

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

<210> 34
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 34

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

<210> 35
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 35

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

<210> 36
<211> 32
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 36

Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 37
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 37

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

<210> 38

<211> 23
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 38

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
 20

<210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 39

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

<210> 40
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 40

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

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

<210> 41
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 41

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 42
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 42

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 43
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 43

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

<210> 44
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 44

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

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

<210> 45
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 45

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 46
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 46

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 47
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 47

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

<210> 48
<211> 32
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 48

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

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

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 49

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 50
<211> 23
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 50

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 51

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

<400> 51

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

<210> 52
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 52

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
1				5					10					15	

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

<210> 53
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 53

Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
1				5					10	

<210> 54
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 54

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

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys
			20			

<210> 55
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 55

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

<210> 56
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 56

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

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

<210> 57
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 57

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 58
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 58

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 59
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de conector peptídico

<400> 59

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

<210> 60

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de conector peptídico

<400> 60

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

Val

<210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de conector peptídico

<400> 61

Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Lys	Leu	Gly	Gly
1				5				

<210> 62
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de conector peptídico

<400> 62

Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Lys	Leu	Gly	Gly
1				5					10

<210> 63
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de conector peptídico

<400> 63

Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro
1				5	

<210> 64
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de conector peptídico

<400> 64

Arg Ala Asp Ala Ala Pro
 1 5

<210> 65
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de conector peptídico

<400> 65

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
 1 5

<210> 66
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de conector peptídico

<400> 66

Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ser
 1 5 10

<210> 67
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de conector peptídico

<400> 67

Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25

<210> 68
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de conector peptídico

<400> 68

Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala
 1 5 10 15

Arg Val

<210> 69
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de conector peptídico

<400> 69

Ala Asp Ala Ala Pro
 1 5

<210> 70
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de conector peptídico

<400> 70

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
 1 5 10

<210> 71
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de conector peptídico

<400> 71

Thr Val Ala Ala Pro
1 5

<210> 72

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de conector peptídico

<400> 72

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
1 5 10

<210> 73

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de conector peptídico

<400> 73

Gln Pro Lys Ala Ala Pro
1 5

<210> 74

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de conector peptídico

<400> 74

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro
1 5 10

<210> 75

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de conector peptídico

<400> 75

Ala Lys Thr Thr Pro Pro
1 5

<210> 76

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de conector peptídico

<400> 76

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Thr Pro Leu Ala Pro
1 5 10

<210> 77

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de conector peptídico

<400> 77

Ala Lys Thr Thr Ala Pro
1 5

<210> 78

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de conector peptídico

<400> 78

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro
1 5 10

<210> 79

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de conector peptídico

<400> 79

Ala Ser Thr Lys Gly Pro
1 5

<210> 80

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de conector peptídico

<400> 80

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
1 5 10

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de conector peptídico

<400> 81

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 82

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de conector peptídico

<400> 82

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

<210> 83

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de conector peptídico

<400> 83

Gly Glu Asn Lys Val Glu Tyr Ala Pro Ala Leu Met Ala Leu Ser
 1 5 10 15

<210> 84
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de conector peptídico

<400> 84

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

<210> 85
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de conector peptídico

<400> 85

Gly His Glu Ala Ala Ala Val Met Gln Val Gln Tyr Pro Ala Ser
 1 5 10 15

<210> 86
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de conector peptídico

<400> 86

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Thr Val Ala Ala
 1 5 10 15

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 20

<210> 87
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de conector peptídico

<400> 87

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ala Ser Thr
1 5 10 15

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
20 25

<210> 88

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de conector peptídico

<400> 88

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 89

<211> 122

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 89

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

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

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

Ala Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 90
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 90

Asn Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95

Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg
 100 105

<210> 91
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 91

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 92

<211> 108

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 92

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30

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

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

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

Val Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Thr Arg Tyr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 93
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 93

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
 100 105 110

Ser Ser

<210> 94
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 94

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Tyr Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg
 100 105

<210> 95
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 95

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ser Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys
 85 90 95

Val Arg Phe Pro Thr Gly Asn Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 96
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 96

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

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

Gly Asn Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
 65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
 85 90 95

Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 97
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 97

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

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

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

Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys

50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 98
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 98
 Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Met Ala Ile Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val Asp
 20 25 30
 Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Val Phe Ile Ile Glu Asn Met Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 99
 <211> 118
 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 99

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn Pro Lys Phe
50 55 60

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

Ile Gln Phe Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 100

<211> 107

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 100

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Val Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 101
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR para el dominio variable de la cadena liviana
3D12.E3

<400> 101
atggtgtcca cagctcagtt cc
22

<210> 102
<211> 29
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR para el dominio variable de la cadena liviana de
3D12.E3

<400> 102
gcagccaccg tacgccggtt tatttcag
29

<210> 103
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR para el gen Ckappa humano

<400> 103
cgtagcgttg ctgcaccatc tgtc
24

<210> 104
<211> 23

<212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para PCR para el gen Ckappa humano

<400> 104
 tcaacactct cccctgttga agc
 23

<210> 105
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para PCR para el dominio variable de la cadena pesada de 3D12.E3

<400> 105
 atggcttggg tgtggacctt gc
 22

<210> 106
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para PCR para el dominio variable de la cadena pesada de 3D12.E3

<400> 106
 gggcccttgg tcgacgctga ggagacggtg actgagg
 37

<210> 107
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para PCR para el gen Cgamma1 humano

<400> 107
 gcgtcgacca agggcccatc ggtcttcc
 28

<210> 108
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR para el gen Cgamma1 humano

<400> 108
tcatttaccc ggagacaggg agaggc
26

<210> 109
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR para el dominio variable de la cadena pesada de 13F5.G5

<400> 109
atagaatgga gctgggtttt cctc
24

<210> 110
<211> 35
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR para el dominio variable de la cadena pesada de 13F5.G5

<400> 110
gggcccttgg tcgacgctga ggagacggtg actga
35

<210> 111
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR para el dominio variable de la cadena liviana de 13F5.G5

<400> 111
atggtcctca tgtccttgct gttc
24

<210> 112
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para PCR para el dominio variable de la cadena liviana de 13F5.G5

<400> 112
gcagccaccg tacgccgttt tatttccagc ttg
34

<210> 113
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR para el dominio variable de la cadena pesada de 3D12.E3

<400> 113
cagatccagt tgggtgcagtc tgg
23

<210> 114
<211> 35
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR para el dominio variable de la cadena pesada de 13F5.G5

<400> 114
caccaactgg atctgtgagg agacggtgac tgagg
35

<210> 115
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR para el dominio variable de la cadena liviana de 3D12.E3

<400> 115
aatatccaga tgacacagac tacatcc
27

<210> 116
<211> 36
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para PCR para el dominio variable de la cadena liviana de 13F5.G5

<400> 116
gtgtcatctg gatattcogt tttatttcca gctttg
36

<210> 117
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR para el dominio variable de la cadena pesada de 13F5.G5

<400> 117
tgggggtgtc gttttggctg agg
23

<210> 118
<211> 36
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR para el dominio variable de la cadena pesada de 3D12.E3

<400> 118
gccaaaacga cccccccaca gatccagttg gtgcag
36

<210> 119
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR para el dominio variable de la cadena liviana de 13F5.G5

<400> 119
tggtgcagca tcagcccggtt ttatttc
27

<210> 120
<211> 33
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para PCR para el dominio variable de la cadena liviana de 3D12.E3

<400> 120
gctgatgctg caccaaataat ccagatgaca cag
33

<210> 121

<211> 243

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio variables pesados en tándem con IL-1alfa/beta DVD-Ig

<400> 121

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

Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Ser	Tyr
		20					25						30		

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

Gly	Gln	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe
	50					55					60				

Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ser	Tyr
65					70					75					80

Met	Gln	Leu	Ser	Gly	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Met	Tyr	Phe	Cys
			85						90					95	

Val	Arg	Phe	Pro	Thr	Gly	Asn	Asp	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		

Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser
		115					120					125			

Gly	Pro	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys
	130					135					140				

Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Arg	Asn	Tyr	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln
145					150					155					160

Ala Pro Gly Lys Asp Leu Lys Arg Met Ala Trp Ile Asn Thr Tyr Thr
 165 170 175

Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser
 180 185 190

Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys
 195 200 205

Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr
 210 215 220

Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 225 230 235 240

Val Ser Ser

<210> 122

<211> 330

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 122

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

<210> 123

<211> 221

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominios variables de la cadena liviana en tándem con IL-1alfa/beta DVD-Ig

<400> 123

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

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

Gly Asn Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Asn Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
115 120 125

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Cys
130 135 140

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
145 150 155 160

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
165 170 175

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 180 185 190

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Tyr
 195 200 205

Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Arg
 210 215 220

<210> 124
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 124

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 1 5 10 15

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 125
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> dominios variables de la cadena pesada en tándem con IL-1alfa/beta
 DVD-Ig

<400> 125

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

Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 225 230 235 240

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 126

<211> 225

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominios variables de la cadena liviana en tándem IL-1alfa/beta
 DVD-Ig

<400> 126

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

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

Gly Asn Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
 65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
 85 90 95

Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

Ala Asp Ala Ala Pro Asn Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
 115 120 125

Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 130 135 140

Asp Ile Ser Asn Cys Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
 145 150 155 160

Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
 165 170 175

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
 180 185 190

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
 195 200 205

Lys Thr Leu Pro Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn
 210 215 220

Arg
 225

<210> 127

<211> 246

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominios variables de la cadena pesada en tandem IL-1alfa/beta
 DVD-Ig

<400> 127

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile
 130 135 140

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

Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Leu Ile Trp
 165 170 175

Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys Ser Arg Leu Ser
 180 185 190

Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser
 195 200 205

Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gln Arg Thr
 210 215 220

Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 225 230 235 240

Ser Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 128

<211> 222

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL-1alfa/beta DVD-Ig dominios variables de la cadena liviana en
 tándem con IL-1alfa/beta DVD-Ig

<400> 128

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30

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

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

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

Val Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Thr Arg Tyr Pro Leu
 85 90 95

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

Pro Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Met Ala Ile
 115 120 125

Gly Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val
 130 135 140

Asp Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu
 145 150 155 160

Ile Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 165 170 175

Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Val Phe Ile Ile Glu Asn Met Leu
 180 185 190

Ser Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro
 195 200 205

Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Arg
 210 215 220

<210> 129

<211> 246

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominios variables de la cadena pesada en tandem IL-1alfa/beta
DVD-Ig

<400> 129

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

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

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

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

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

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

Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
100 105 110

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

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
130 135 140

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Leu Asn Ile Lys Asp Thr
145 150 155 160

Tyr Met His Trp Leu Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
165 170 175

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ala Lys Tyr Asp Pro Arg Phe
180 185 190

Leu Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
195 200 205

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 210 215 220

Ala Arg Gly Asp Gly Asn Phe His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 225 230 235 240

Thr Leu Thr Val Ser Ser
 245

<210> 130
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> dominios variables de la cadena liviana en tándem con IL-
 1alfa/beta DVD-Ig

<400> 130

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

Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val Asp
 20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Val Phe Ile Ile Glu Asn Met Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Ser Val
 115 120 125

Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr
 130 135 140

Asn Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Ala Leu
 145 150 155 160

Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr
 165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln
 180 185 190

Ser Val Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Thr Arg Tyr Pro
 195 200 205

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 210 215 220

<210> 131

<211> 253

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL-1alfa/beta DVD-Ig dominios variables de la cadena pesada en
 tándem con IL-1alfa/beta DVD-Ig

<400> 131

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ala Pro Gln Val His Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
 130 135 140

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
 145 150 155 160

Thr Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 165 170 175

Glu Trp Leu Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser
 180 185 190

Pro Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
 195 200 205

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Val Tyr
 210 215 220

Tyr Cys Ala Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met
 225 230 235 240

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 245 250

<210> 132

<211> 228

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominios variables de la cadena liviana en tándem con IL-
 1alfa/beta DVD-Ig

<400> 132

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30

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

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

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

Val Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Thr Arg Tyr Pro Leu
 85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro
 115 120 125

Ala Ser Leu Ser Met Ala Ile Gly Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile
 130 135 140

Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val Asp Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 145 150 155 160

Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro
 165 170 175

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Val
 180 185 190

Phe Ile Ile Glu Asn Met Leu Ser Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys
 195 200 205

Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
 210 215 220

Glu Leu Lys Arg
 225

<210> 133

<211> 253

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominios variables de la cadena pesada en tándem con IL-1alfa/beta
DVD-Ig

<400> 133

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

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

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

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

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

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

Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
100 105 110

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

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala
130 135 140

Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser
145 150 155 160

Gly Leu Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Leu Lys Gln Arg Pro
165 170 175

Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn
180 185 190

Ala Lys Tyr Asp Pro Arg Phe Leu Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp

195 200 205
 Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
 210 215 220
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Gly Asn Phe His Phe
 225 230 235 240
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 245 250

 <210> 134
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> dominios variables de la cadena liviana en tándem con IL-
 1alfa/beta DVD-Ig

 <400> 134

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

 Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val Asp
 20 25 30

 Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

 Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
 50 55 60

 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Val Phe Ile Ile Glu Asn Met Leu Ser
 65 70 75 80

 Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu
 85 90 95

 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln
 115 120 125

Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys
 130 135 140

Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 145 150 155 160

Gly Gln Ser Pro Arg Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
 165 170 175

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 180 185 190

Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Val Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys
 195 200 205

Gln Gln Tyr Thr Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 210 215 220

Glu Ile Lys Arg
 225

<210> 135

<211> 238

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominios variables de la cadena pesada en tandem IL-1alfa/beta
 DVD-Ig

<400> 135

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

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

Lys Asp Thr Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65		70		75		80									
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Tyr	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val
			100					105					110		
Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly
		115					120					125			
Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Thr	Gly	Thr	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala
	130					135					140				
Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Gly	Tyr	Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ser
145					150					155					160
His	Gly	Lys	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser	Cys	Tyr	Asn	Gly
				165					170					175	
Phe	Thr	Ser	Tyr	Asn	Pro	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Phe	Thr	Val
			180					185					190		
Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Ile	Gln	Phe	Ser	Arg	Leu	Thr	Ser
		195					200					205			
Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Thr
	210					215					220				
Asn	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser		
225					230					235					
<210> 136															
<211> 219															
<212> PRT															
<213> Secuencia artificial															
<220>															
<223> dominios variables de la cadena liviana en tándem con IL-1alfa/beta DVD-Ig															
<400> 136															
Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Leu	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Tyr Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 115 120 125

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 130 135 140

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 145 150 155 160

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Val Ser Arg Met Glu Ala Glu
 180 185 190

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Tyr Thr
 195 200 205

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 210 215

<210> 137

<211> 238

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominios variables de la cadena pesada en tándem IL-1alfa/beta
DVD-Ig

<400> 137

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

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

Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			

Gly	Tyr	Ile	Ser	Cys	Tyr	Asn	Gly	Phe	Thr	Ser	Tyr	Asn	Pro	Lys	Phe
	50					55					60				

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

Ile	Gln	Phe	Ser	Arg	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	

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

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

Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Leu
	130					135					140				

Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Thr	Tyr	Trp	Met	Asn	Trp
145					150					155					160

Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Glu	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	Asp
				165					170					175	

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

Ile	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser
		195					200					205			

Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly
 210 215 220

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 225 230 235

<210> 138

<211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominios variables de la cadena liviana en tándem IL-1alfa/beta
 DVD-Ig

<400> 138

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Val Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
 115 120 125

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
 130 135 140

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 145 150 155 160

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 180 185 190

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Tyr Thr
 195 200 205

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg
 210 215

<210> 139

<211> 245

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominios variables de la cadena pesada en tándem con IL-1alfa/beta
 DVD-Ig

<400> 139

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
 100 105 110

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

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Thr Gly Thr Ser
 130 135 140

Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Tyr
 145 150 155 160

Met His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly
 165 170 175

Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn Pro Lys Phe Lys
 180 185 190

Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Ile
 195 200 205

Gln Phe Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 210 215 220

Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Thr Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Val Ser Ser
 245

<210> 140

<211> 227

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominios variables de la cadena liviana en tándem con IL-
 1alfa/beta DVD-Ig

<400> 140

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Tyr Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala
 115 120 125

Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala
 130 135 140

Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ala
 145 150 155 160

Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
 165 170 175

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr
 180 185 190

Val Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 195 200 205

Arg Ser Thr Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 210 215 220

Lys Arg Arg
 225

<210> 141

<211> 245

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominios variables de la cadena pesada en tándem con IL-1alfa/beta
DVD-Ig

<400> 141

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

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

Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			

Gly	Tyr	Ile	Ser	Cys	Tyr	Asn	Gly	Phe	Thr	Ser	Tyr	Asn	Pro	Lys	Phe
	50					55					60				

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

Ile	Gln	Phe	Ser	Arg	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	

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

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

Leu	Ala	Pro	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg
	130					135					140				

Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe
145					150					155				160	

Thr	Thr	Tyr	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Glu	Gln	Gly	Leu
				165					170					175	

Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Tyr	Asp	Ser	Glu	Thr	Leu	Tyr	Ser
			180					185					190		

Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Thr	Ala	Ile	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser
		195					200					205			

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Val Ser Ser
 245

<210> 142
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> dominios variables de la cadena liviana en tándem con IL-
 1alfa/beta DVD-Ig

<400> 142

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Val Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala
 115 120 125

Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala

130 135 140
 Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser
 145 150 155 160

 Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
 165 170 175

 Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr
 180 185 190

 Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 195 200 205

 Trp Asn Ser Asn Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met
 210 215 220

 Lys Arg Arg
 225

 <210> 143
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> dominios variables de la cadena pesada en tandem con mIL-
 1alfa/beta DVD-Ig

 <400> 143

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

 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

 Gly Tyr Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Asn Glu Tyr Tyr Gly Ser Ser Phe Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gln Val Ile Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly
130 135 140

Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly
145 150 155 160

Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Gly Thr Ala Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro
165 170 175

Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala Gln Ile Gly Ser Asp Asp Arg
180 185 190

Lys Leu Tyr Asn Pro Phe Leu Lys Ser Arg Ile Thr Leu Ser Glu Asp
195 200 205

Thr Ser Asn Ser Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Glu
210 215 220

Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Asn Gly Val Met Glu Tyr Trp Gly
225 230 235 240

Leu Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 144

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena pesada de 10G11

<400> 144

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Asn Glu Tyr Tyr Gly Ser Ser Phe Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 145

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena pesada de 9H10

<400> 145

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

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

Gly Thr Ala Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala Gln Ile Gly Ser Asp Asp Arg Lys Leu Tyr Asn Pro Phe
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Ile Thr Leu Ser Glu Asp Thr Ser Asn Ser Gln Val

Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp
145 150 155 160

Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg
165 170 175

Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln
180 185 190

His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn
195 200 205

Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
210 215 220

Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met
245 250 255

Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu
260 265 270

Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe
275 280 285

Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn
290 295 300

Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
305 310 315 320

Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
325 330

<210> 147

<211> 228

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominios variables de la cadena liviana en tándem con mIL-1alfa/beta DVD-Ig

<400> 147

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Gly Ser Gly Ile Leu His Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Ser Ala Lys Ile Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
 100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro
 115 120 125

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

Ala Ser Gln Ser Val Asn His Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Met Pro
 145 150 155 160

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 165 170 175

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr
 180 185 190

Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys
 195 200 205

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 210 215 220

Glu Ile Lys Arg
225

<210> 148
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> dominio variable de la cadena liviana de 10G11

<400> 148

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Gly Ser Gly Ile Leu His Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Lys Ile Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 149
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> dominio variable de la cadena liviana de 9H10

<400> 149

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

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

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

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

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

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 150

<211> 106

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 150

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
1 5 10 15

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

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
35 40 45

Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
65 70 75 80

His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
85 90 95

Ile	Val	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Asn	Glu	Cys
			100					105	

<210> 151

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CARACT_MISC

<222> (2)..(9)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 151

Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5				

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To: LEON R. YANKWICH
YANKWICH & ASSOCIATES, P.C.
201 BROADWAY
CAMBRIDGE, MA 02139

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year)

23 AUG 2012

Applicant's or agent's file reference
ABT-122.1PCT

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

International application No.

PCT/US 12/24356

International filing date (day/month/year)

08 February 2012 (08.02.2012)

Priority date (day/month/year)

08 February 2011 (08.02.2011)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

IPC(8) - A61K 39/395; C07K 16/00 (2012.01)

USPC - 424/158.1, 530/388.23

Applicant ABBOTT LABORATORIES

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1 bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Date of completion of this opinion

23 July 2012 (23.07.2012)

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US 12/24356

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed.
- ☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

- ☐ on paper
- ☐ in electronic form

b. (time)

- ☐ in the international application as filed
- ☐ together with the international application in electronic form
- ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US 12/24356

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ paid additional fees
- ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
- ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
- ☒ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with
- ☒ not complied with for the following reasons:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

Group I-II: claims 1-15, drawn to a method for treating osteoarthritis in an individual comprising the step of administering to the individual a binding protein that binds IL-1alpha and a binding protein that binds IL-1beta; or a binding protein that binds both IL-1a and IL-1b, respectively.

[NOTE: Claims 5, 7, 9, 11 were excluded from the search, because they are drawn to a non-elected subject matter.]

Group III: claims 17-35, drawn to a method for treating pain in an individual comprising the step of administering to the individual: a binding protein that binds IL-1a and a binding protein that binds IL-1b, wherein the binding proteins are administered to the individual in a mixture, concurrently, or successively; or a binding protein that binds both IL-1a and IL-1b.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The inventions of Group I do not include the inventive concept of a method for treating pain in an individual, as required by Group II.

The inventions of Group II do not include the inventive concept of a method for treating osteoarthritis in an individual, as required by Group I.

The inventions of Groups I-II share the technical feature of a method for treating osteoarthritis in an individual (defined by Applicant as human or other mammal, see pg 4, ln 16-17) comprising the step of administering to the individual a binding protein that binds IL-1alpha and a binding protein that binds IL-1beta. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by an article titled "IL-1 alpha/beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation" by Joosten, et al. (J Immunol. 1999, 163(9):5049-55) (hereinafter "Joosten") that discloses that an "anti-IL-1 treatment ameliorated disease activity when applied shortly after onset of CIA [collagen-induced arthritis]. ... anti-IL-1 treatment of established CIA normalized COMP levels, apparently alleviating the process in the tissue. Histology of knee and ankle joints corroborated the finding and showed that cartilage and joint destruction was significantly decreased after anti-IL-1 treatment... Radiographic analysis of knee and ankle joints revealed that bone erosions were prevented by anti-IL-1 treatment... metalloproteinase activity, visualized by VDIPEN production, was almost absent throughout the cartilage layers in anti-IL-1-treated animals... These results indicate that blocking of IL-1 is a cartilage- and bone-protective therapy in destructive arthritis..." (Abstract) and further specifically discloses anti-IL-1a and IL-1b antibody (pg 5050, col 1, "[t]o eliminate IL-1a/1b, mice received one single injection of purified (IgG fraction) rabbit anti-murine IL-1a and anti-IL-1b (1 mg of each Ig)"). As said method would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

In addition, a binding protein that binds both IL-1a and IL-1b was known on the art at the time of the invention, as evidenced by a paper titled "Molecular construction and optimization of anti-human IL-1a/b dual variable domain immunoglobulin (DVD-IgTM) molecules" by Wu, et al. (MAbs. 2009 Jul-Aug;1(4):339-47) (hereinafter "Wu").

Groups I-III therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

4. Consequently, this opinion has been established in respect of the following parts of the international application:

- ☐ all parts
- ☒ the parts relating to claims Nos. 1-4, 6, 8, 10, 12-16

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US 12/24356

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	<u>6, 8, 10, 12-16</u>	YES
	Claims	<u>1-4</u>	NO
Inventive step (IS)	Claims	<u>NONE</u>	YES
	Claims	<u>1-4, 6, 8, 10, 12-16</u>	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	<u>1-4, 6, 8, 10, 12-16</u>	YES
	Claims	<u>NONE</u>	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1-4 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by an article titled "IL-1 alpha/beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation" by Joosten, et al. (hereinafter "Joosten").

As to claims 1-4, Joosten discloses a method for treating osteoarthritis in an individual (defined by Applicant as human or other mammal, see pg 4, ln 16-17) comprising the step of administering to the individual a binding protein that binds IL-1alpha and a binding protein that binds IL-1beta (Abstract, an "anti-IL-1 treatment ameliorated disease activity when applied shortly after onset of CIA [collagen-induced arthritis]. ... anti-IL-1 treatment of established CIA normalized COMP levels, apparently alleviating the process in the tissue. Histology of knee and ankle joints corroborated the finding and showed that cartilage and joint destruction was significantly decreased after anti-IL-1 treatment... Radiographic analysis of knee and ankle joints revealed that bone erosions were prevented by anti-IL-1 treatment... metalloproteinase activity, visualized by VDIPEN production, was almost absent throughout the cartilage layers in anti-IL-1-treated animals... These results indicate that blocking of IL-1 is a cartilage- and bone-protective therapy in destructive arthritis..") and further specifically discloses anti-IL-1a and IL-1b antibody (pg 5050, col 1, "[t]o eliminate IL-1a/1b, mice received one single injection of purified (IgG fraction) rabbit anti-murine IL-1a and anti-IL-1b (1 mg of each Ig)").

Claim 16 lacks an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Joosten, as above.

As to claim 16, Joosten discloses that "[t]o eliminate IL-1a/1b, mice received one single injection of purified (IgG fraction) rabbit anti-murine IL-1a and anti-IL-1b (1 mg of each Ig). This dose revealed to be sufficient to suppress several murine arthritis models such as Ag-induced arthritis, immune complex-induced arthritis, and CIA" (pg 5050, col 1), but does not disclose a specific mode of administering said antibodies. It would have been obvious to one of ordinary skill in the art how to, in the course of routine experimentation and with a reasonable expectation of success select an optimal route of administration of said antibodies.

Claims 6, 8, 10, 12-15 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Joosten, as above, in view of US 2011/0008766 A1 to Ghayur, et al. (hereinafter "Ghayur").

As to claims 6, 10 and 12, Joosten does not teach that said binding protein that binds IL-1a and said binding protein that binds IL-1b are formulated in a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier. Ghayur discloses "a formulation that ... comprises a crystallized binding protein... and an ingredient, and at least one polymeric carrier. For example, the polymeric carrier comprises one or more polymers selected from the group consisting of: poly (acrylic acid), poly (cyanoacrylates), poly (amino acids), poly (anhydrides), poly (depsipeptide), poly (esters), poly (lactic acid), poly (lactic-co-glycolic acid) or PLGA, poly (b-hydroxybutyrate), poly (caprolactone), poly (dioxanone), poly (ethylene glycol), poly ((hydroxypropyl) methacrylamide, poly [(organo)phosphazene], poly (ortho esters), poly (vinyl alcohol), poly (vinylpyrrolidone), maleic anhydride-alkyl vinyl ether copolymers, pluronic polyols, albumin, alginate, cellulose and cellulose derivatives, collagen, fibrin, gelatin, hyaluronic acid, oligosaccharides, glycaminoglycans, sulfated polysaccharides, blends and copolymers thereof (para [0058]). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to combine Joosten and Ghayur by formulating, in the course of routine experimentation and with a reasonable expectation of success, a pharmaceutical composition comprising a suitable polymeric pharmaceutically acceptable carrier among those disclosed by Ghayur, to achieve an optimal response from a patient upon administering the composition at issue.

As to claim 8, Joosten does not teach that said binding protein that binds IL-1a and said binding protein that binds IL-1b are crystallized. Ghayur discloses "a crystallized binding protein and exists as a crystal. In an embodiment the crystal is a carrier-free pharmaceutical controlled release crystal" (para [0053]). One of ordinary skill in the art would have been motivated to combine Joosten and Ghayur by crystallizing, in the course of routine experimentation and with a reasonable expectation of success, the anti-IL-1a and anti-IL-1b antibody of Joosten, such as to formulate a carrier-free pharmaceutical controlled release crystal, as in Ghayur, because Ghayur further teaches that "the crystallized binding protein has a greater half life in vivo than the soluble counterpart of said binding protein" (para [0053], see also para [0116], [0245]).

***** See Supplemental Sheet to continue *****

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US 12/24356

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:

Box IV. Lack of unity of invention:

As to claim 13, Joosten does not teach that said ingredient is selected from the group consisting of albumin, sucrose, trehalose, lactitol, gelatin, hydroxypropyl-beta-cyclodextrin, methoxypolyethylene glycol and polyethylene glycol. This limitation is taught by Ghayur (para [0058]). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to combine Joosten and Ghayur by formulating, in the course of routine experimentation and with a reasonable expectation of success, a pharmaceutical composition comprising a suitable pharmaceutically ingedient among those disclosed by Ghayur, to achieve an optimal response from a patient upon administering te composition at issue (see Ghayur, para [0301], " [t]he compositions... may contain formulatory agents, such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents").

As to claims 14 and 15, Joosten does not teach administering to the individual a second agent that provides a desirable property. This limitation is taught by Ghayur (para [0059]). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to combine Joosten and Ghayur by formulating, in the course of routine eperimentation and with a reasonable expectation of success, a pharmaceutical composition comprising a suitable second agent that provides a desirable property based on the disclosure of Ghayur, to achieve an optimal response from a patient upon administering te composition at issue.

Claims 1-4, 6, 8, 10, 12-16 have industrial applicability as defined by PCT Article 33(4) because the subject matter can be made or used in industry.

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **ANA MARIA CASTRO WEY** y/o **ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.



ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No. 2012-10-11-679
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

Estado de Illinois
Secretario de Estado
País de Destino: COLOMBIA

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Jillian A. Pare
3. actuando como Notario Público, Condado de Lake
4. lleva el sello/estampilla del Estado de Illinois

Certificado

5. en Chicago, Illinois
6. el 5 de octubre de 2012
7. por el Secretario de Estado, Estado de Illinois
8. No. C12SR24081
9. Sello/Estampilla
Sello del Estado de Illinois

10. Firma: (ilegible)
Jesse White
Secretario de Estado
Estado de Illinois

Esta Apostilla certifica exclusivamente la firma y el sello o estampilla que lleva. No certifica el contenido del documento para el cual se expidió.
ESTA APOSTILLA NO ES VALIDA DENTRO DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA


ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

Dado y firmado este

(firma: ilegible)

Thomas C. Freyman

Vicepresidente Ejecutivo, Director Financiero

AbbVie Inc.

Fecha: 9 / 21 / 12

Estado de Illinois

Condado de Lake

Firmado y testificado ante mí el 9 / 27 / 12 por Thomas C. Freyman

Firma (ilegible)

Sello Oficial

Jillian A. Pare

Notario Público - Estado de Illinois

Mi nombramiento expira: 01/25/13

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 11 de octubre de 2012, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA
Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



AbbVie Inc., a company organized and existing under the laws of Delaware

AbbVie, Inc., una compañía organizada y existente bajo las leyes del Estado de Delaware.

domiciled at

con domicilio en
1 North Waukegan Road, North Chicago,
Illinois 60064, Estados Unidos de América

1 North Waukegan Road, North Chicago, Illinois
60064, U.S.A

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o ANA MARIA CASTRO y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

hereby appoint, ALICIA LLOREDA y/o ANA MARIA CASTRO y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o ANA MARIA CASTRO y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

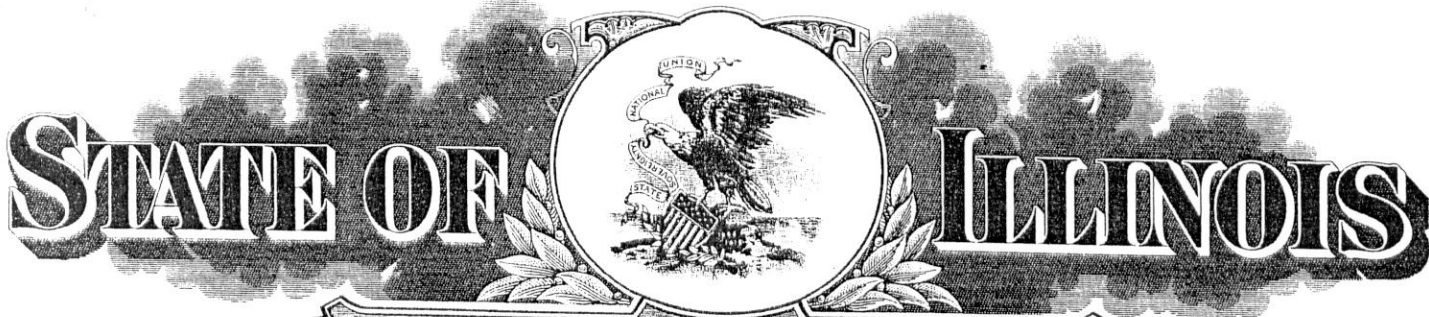
Doctors ALICIA LLOREDA y/o ANA MARIA CASTRO y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o ANA MARIA CASTRO y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA y/o ANA MARIA CASTRO y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Dado y firmado

The undersigned,



SECRETARY OF STATE

COUNTRY OF DESTINATION: COLOMBIA

APOSTILLE

Convention de La Haye du 5 Octobre 1961

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by JILLIAN A. PARE
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC, LAKE COUNTY
4. bears the seal/stamp of STATE OF ILLINOIS

Certified

5. Chicago, Illinois
6. OCTOBER 5, 2012
7. by the Secretary of State, State of Illinois
8. No. C12SR24081
9. Seal/Stamp:
10. Signature:

Jesse White

JESSE WHITE
SECRETARY OF STATE
STATE OF ILLINOIS



This Apostille only certifies the signature and the seal or stamp it bears. It does not certify content of the document for which it was issued.

THIS APOSTILLE IS NOT VALID WITHIN THE UNITED STATES OF AMERICA.

♻️ Printed on recycled paper. Printed by authority of the State of Illinois. April 2012 — 110M — I 168.3

Given and signed this

Thomas C. Freyman

Thomas C. Freyman

Executive Vice President, Finance and Chief Financial Officer

AbbVie Inc.

Date: 9/27/12

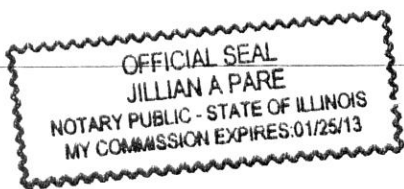
State of Illinois

County of Lake

Signed and attested before me on 9/27/12 by Thomas C. Freyman

Signature

Jillian A. Pare





(43) International Publication Date
16 August 2012 (16.08.2012)

(10) International Publication Number
WO 2012/109373 A3

(51) International Patent Classification:
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/00* (2006.01)

SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(21) International Application Number:
PCT/US2012/024356

(84) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(22) International Filing Date:
8 February 2012 (08.02.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/440,853 8 February 2011 (08.02.2011) US

Declarations under Rule 4.17:

(71) Applicant (*for all designated States except US*): **ABBOTT LABORATORIES** [US/US]; 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064 (US).

— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*

(72) Inventor; and

— *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*

(75) Inventor/Applicant (*for US only*): **KAMATH, Rajesh, V.** [IN/US]; 27 Redland Street, Shrewsbury, MA 01545 (US).

— *of inventorship (Rule 4.17(iv))*

(74) Agents: **YANKWICH, Leon, R.** et al.; Yankwich & Associates, P.C., 201 Broadway, Cambridge, MA 02139 (US).

Published:

(81) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD,

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(88) Date of publication of the international search report:

1 November 2012

(54) Title: TREATMENT OF OSTEOARTHRITIS AND PAIN

(57) Abstract: The present invention relates to the treatment of osteoarthritis and pain using IL-1 α and IL-1 β binding proteins, including anti-IL-1 α and IL-1 β antibodies and engineered multivalent and multispecific IL-1 α and IL-1 β binding proteins.



WO 2012/109373 A3

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference ABT-122.1PCT	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US 12/24356	International filing date (<i>day/month/year</i>) 08 February 2012 (08.02.2012)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 08 February 2011 (08.02.2011)
Applicant ABBOTT LABORATORIES		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:



the international application in the language in which it was filed.



a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (see Box No. II).

3. ☒ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III).

4. With regard to the **title**,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____



as suggested by the applicant.



as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.



as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/24356

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

Group I-II: claims 1-15, drawn to a method for treating osteoarthritis in an individual comprising the step of administering to the individual a binding protein that binds IL-1alpha and a binding protein that binds IL-1beta; or a binding protein that binds both IL-1a and IL-1b, respectively.

Group III: claims 17-35, drawn to a method for treating pain in an individual comprising the step of administering to the individual: a binding protein that binds IL-1a and a binding protein that binds IL-1b, wherein the binding proteins are administered to the individual in a mixture, concurrently, or successively; or a binding protein that binds both IL-1a and IL-1b.

***** See Supplemental Sheet to continue *****

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-4, 6, 8, 10, 12-16, restricted to administering a binding protein that binds IL-1alpha and a binding protein that binds IL-1beta

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/24356

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 39/395; C07K 16/00 (2012.01)

USPC - 424/158.1, 530/388.23

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

USPC- 424/158.1, 530/388.23

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC- 424/85.2Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); Google Patents; Google Scholar: Osteoarthritis, degenerative arthritis, degenerative joint disease, osteoarthrosis, IL-1, Interleukin 1alpha, Interleukin 1beta

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Joosten, et al. IL-1 alpha/beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation. J Immunol. 1999, 163(9):5049-55; Abstract, pg 5050, col 1	1-4,16 ----- 6, 8, 10, 12-15
Y	US 2011/0008766 A1 (Ghayur, et al.) 13 January 2011 (13.01.2011) para [0053], [0058], [0059], [0116], [0245], [0301]	6, 8, 10, 12-15
X, P	Chevalier, et al. Desperately looking for the right target in osteoarthritis: the anti-IL-1 strategy. Arthritis Res Ther. 26 August 2011, 13(4):124; Abstract	1-4
A	Malemud. Anticytokine therapy for osteoarthritis: evidence to date. Drugs Aging. 2010, 27(2):95-115; Abstract	1-4
A	Chevalier. Upregulation of enzymatic activity by interleukin-1 in osteoarthritis. Biomed Pharmacother. 1997, 51(2):58-62; Abstract	1-4
A	Niger, et al. Interleukin-1beta Increases Gap Junctional Communication among Synovial Fibroblasts via the Extracellular Signal Regulated Kinase Pathway. Biol Cell. 2009, 102(1): 37-49	1-4
A	Joosten, et al. Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF alpha, anti-IL-1 alpha/beta, and IL-1Ra. Arthritis Rheum. 1996, 39(5):797-809	1-4
A	US 2010/0303807 A1 (Solinger, et al.) 02 December 2010 (02.12.2010) para [0073] [0079]	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 July 2012 (23.07.2012)

Date of mailing of the international search report

23 AUG 2012

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/24356

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2009/0226461 A1 (Masat, et al.) 10 September 2009 (10.09.2010)	1-4
A	US 2008/0292640 A1 (Solinger, et al.) 27 November 2008 (27.11.2008)	1-4
A	US 2009/0060923 A1 (Masat, et al.) 05 March 2009 (05.03.2009)	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/24356

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The inventions of Group I do not include the inventive concept of a method for treating pain in an individual, as required by Group II.

The inventions of Group II do not include the inventive concept of a method for treating osteoarthritis in an individual, as required by Group I.

The inventions of Groups I-II share the technical feature of a method for treating osteoarthritis in an individual (defined by Applicant as human or other mammal, see pg 4, ln 16-17) comprising the step of administering to the individual a binding protein that binds IL-1alpha and a binding protein that binds IL-1beta. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by an article titled "IL-1 alpha/beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation" by Joosten, et al. (J Immunol. 1999, 163(9):5049-55) (hereinafter "Joosten") that discloses that an "anti-IL-1 treatment ameliorated disease activity when applied shortly after onset of CIA [collagen-induced arthritis]. ... anti-IL-1 treatment of established CIA normalized COMP levels, apparently alleviating the process in the tissue. Histology of knee and ankle joints corroborated the finding and showed that cartilage and joint destruction was significantly decreased after anti-IL-1 treatment... Radiographic analysis of knee and ankle joints revealed that bone erosions were prevented by anti-IL-1 treatment... metalloproteinase activity, visualized by VDIPEN production, was almost absent throughout the cartilage layers in anti-IL-1-treated animals... These results indicate that blocking of IL-1 is a cartilage- and bone-protective therapy in destructive arthritis..." (Abstract) and further specifically discloses anti-IL-1a and IL-1b antibody (pg 5050, col 1, "[t]o eliminate IL-1a/1b, mice received one single injection of purified (IgG fraction) rabbit anti-murine IL-1a and anti-IL-1b (1 mg of each Ig)"). As said method would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

In addition, a binding protein that binds both IL-1a and IL-1b was known on the art at the time of the invention, as evidenced by a paper titled "Molecular construction and optimization of anti-human IL-1a/b dual variable domain immunoglobulin (DVD-IgTM) molecules" by Wu, et al. (MAbs. 2009 Jul-Aug;1(4):339-47) (hereinafter "Wu").

Groups I-III therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

 SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO PATENTE DE INVENCION ____ PCT <u>X</u> MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____	
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 27-08-13 (51) Clasificación Internacional: A61K 39/395 (71) Solicitante(s): ABBVIE, INC. (72) Inventor(es): KAMATH, Rajesh, V. (74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE (30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País 61/440,853 08-02-11 US (85) Fecha límite inicio fase nacional: 08-09-13 (86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT Fecha de presentación de la solicitud: 08-02-12 No. de solicitud: PCT/US2012/024356 (87) Publicación internacional: Fecha: 16-08-12 No. Publicación: WO 2012/109373 A3	
(54) Título: TRATAMIENTO DE LA OSTEOARTRITIS Y DEL DOLOR. (57) Resumen - Reivindicación(es): Resumen.- Tratamiento de la osteoartritis y del dolor usando proteínas de unión a IL-1α e IL-1β, incluyendo anticuerpos anti-IL-1α y anti-IL-1β y proteínas de unión IL-1α e IL-1β manipuladas multivalentes y de especificidad múltiple. Sector: Preparaciones que comprenden proteínas de unión a IL-1α e IL-1β, incluyendo anticuerpos anti-IL-1α y anti-IL-1β y proteínas de unión IL-1α e IL-1β manipuladas multivalentes y de especificidad múltiple útiles en el tratamiento de tratar la osteoartritis (OA) y para tratar el dolor.	

 SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS PATENTE DE INVENCION ____ PCT <u>X</u> MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____	
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 27-08-13 (51) Clasificación Internacional: A61K 39/395 (71) Solicitante(s): ABBVIE, INC. (72) Inventor (es): KAMATH, Rajesh, V. (74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE (30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País 61/440,853 08-02-11 US (85) Fecha límite inicio fase nacional: 08-09-13 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 08-02-12 No. de solicitud: PCT/US2012/024356 (87) Publicación internacional Fecha: 16-08-12 No. publicación: WO 2012/109373 A3	
(54) Título: TRATAMIENTO DE LA OSTEOARTRITIS Y DEL DOLOR.	

TRADUCCION OFICIAL No. 2013-08-15-418
DE UN DOCUMENTO PRESENTADO EN INGLES

TRASPASO

Yo/Nosotros,

Rajesh V. Kamath,

residentes, respectivamente, en

27 Redland Street, Shresbury, MA 01545, EE.UU.

por una contraprestación buena y valiosa, el recibo de lo cual se reconoce por el presente, he traspasado, vendido y transferido a y por el presente traspaso, vendo y transfiero a Abbott Laboratories, una sociedad organizada y existente bajo las leyes del Estado de Illinois y que tiene su domicilio en 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064, sus sucesores y cesionarios:

1) todo el derecho, título e interés en los Estados Unidos y en todos los países del mundo en y de cualquiera y todas mis/nuestras invenciones y descubrimientos revelados en la Solicitud de los Estados Unidos No. Serial 13/369,177, presentada el 8 de febrero de 2012 {Expediente Apoderado No. ABT-122.1 EE.UU.; Expediente Cliente No. 10918US01} y Solicitud Internacional No. Serial PCT/US2012/024356, presentada el 8 de febrero de 2012 {Expediente Apoderado No. ABT-122.1 PCT; Expediente Cliente No. 10918WOO11} y designando a AP, EA, EP, OA, AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BE, BF, BG, BH, BJ, BR, BW, BY, BZ, CA, CF, CG, CH, y LI, CI, CL, CM, CN, CO, CR, CU, CY, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GA, GB, GD, GE, GH, GM, GN, GQ, GR, GT, GW, HR, HN, HU, ID, IE, IL, IN, IS, IT, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MC, MD, ME, MG, MK, ML, MN, MR, MW, MX, MY, MZ, NA, NE, NG, NI, NL, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SM, SN, ST, SV, SY, SZ, TD, TG, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, ZA, ZM y ZW; llamada: "TRATAMIENTO DE OSTEOARTRITIS Y DOLOR", incluyendo cualquier renovación, recuperación, reemisión, reexamen, extensión, continuación y división de la misma, y cualquier solicitud sustituta, por lo tanto, con vigencia el 8 de febrero de 2012;

2) el derecho pleno y completo para presentar solicitudes de patente en nombre de Abbott Laboratories, su persona nombrada, o en mi nombre a elección de Abbott Laboratories o su persona nombrada, sobre las invenciones, descubrimientos y solicitudes anteriormente nombrados en todos los países del mundo;

3) todo el derecho, título e interés en y de cualquier Patente de Invención que pueda expedirse sobre ello en los Estados Unidos o en cualquier otro país del mundo y cualquier renovación, recuperación, reemisión reexamen y extensión de la misma; y

4) todo el derecho, título e interés en todas las Convenciones y Derechos de Tratados de toda clase sobre ello, incluyendo sin limitación todos los derechos de prioridad en cualquier país del mundo, en y de las invenciones, descubrimientos y solicitudes anteriores.

Por el presente autorizo y le solicito a las autoridades competentes que otorguen y expidan cualquiera y todas las Patente de Invención en los Estados Unidos y en todo el mundo a Abbott Laboratories como el cesionario de todo el derecho, título e interés en el presente, tan completa y enteramente como si el mismo hubiese sido tenido y disfrutado por mí si este traspaso, venta y transferencia no se hubiesen hecho.

Además acuerdo, en cualquier momento, a solicitud de Abbott Laboratories, ejecutar y entregar a Abbott Laboratories cualquier solicitud adicional para patente para dichas invenciones y descubrimientos, o cualquier parte o partes de ello, y cualquier solicitud para patente de confirmación, registro e importación con base en cualquier Patente de Invención que se expida sobre dichas invenciones, descubrimientos o solicitudes, y divisiones, continuaciones, renovaciones, recuperaciones, reemisiones, reexámenes y extensiones de ello.

Además acuerdo en cualquier momento ejecutar y entregar a solicitud de Abbott Laboratories dichos documentos adicionales, si hubiese, según sean necesarios o deseables para asegurar la protección de patente sobre dichas invenciones, descubrimientos y solicitudes en todos los países del mundo, y de lo contrario hacer lo que sea necesario para darle pleno efecto a y perfeccionar los derechos de Abbott Laboratories bajo este Traspaso, incluyendo la ejecución, entrega y procura de cualquiera y todos los documentos adicionales que evidencien este traspaso, transferencia y venta según sea necesario o deseable.

CEDENTE:

(1) (firma: ilegible)

Rajesh V. KAMATH

RECONOCIMIENTO:

En este día 2 de abril de 2012, Rajesh V. KAMATH compareció personalmente ante mí, ejecutó el Traspaso anterior, y reconoció debidamente ante mí que dicho Traspaso fue ejecutado como su acto y acción libre para los fines y propósitos ahí expresados.

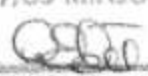
(firma: ilegible)

Firma del testigo

(firma: ilegible)

Nombre del testigo

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 15 de agosto de 2013, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

ASSIGNMENT

I/We,

Rajesh V. KAMATH,

residing at

27 Redland Street, Shrewsbury, Massachusetts 01545, US

for good and valuable consideration, receipt of which is hereby acknowledged, have assigned, sold and transferred to and do hereby assign, sell and transfer to Abbott Laboratories, a corporation organized and existing under the laws of the State of Illinois and having an office and a place of business at 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064, its successors and assigns:

1) the entire right, title and interest in the United States and in all countries throughout the world in and to any and all my/our inventions and discoveries disclosed in United States Application Ser. No. 13/369,177, filed 8 February 2012 {Atty. Docket No. ABT-122.1 US ; Client Docket No. 10918USO1} and International Application Serial No. PCT/US2012/024356, filed 8 February 2012 {Atty. Docket No. ABT-122.1 PCT; Client Docket No. 10918WOO1} and designating AP, EA, EP, OA, AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BE, BF, BG, BH, BJ, BR, BW, BY, BZ, CA, CF, CG, CH and LI, CI, CL, CM, CN, CO, CR, CU, CY, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GA, GB, GD, GE, GH, GM, GN, GQ, GR, GT, GW, HR, HN, HU, ID, IE, IL, IN, IS, IT, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MC, MD, ME, MG, MK, ML, MN, MR, MW, MX, MY, MZ, NA, NE, NG, NI, NL, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SM, SN, ST, SV, SY, SZ, TD, TG, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM and ZW; entitled: "TREATMENT OF OSTEOARTHRITIS AND PAIN", including any renewals, revivals, reissues, reexaminations, extensions, continuations and divisions thereof, and any substitute applications therefore, effective as of the filing date of 8 February 2012;

2) the full and complete right to file patent applications in the name of Abbott Laboratories, its designee, or in my name at the election of Abbott Laboratories or its designee, on the aforesaid inventions, discoveries and applications in all countries of the world;

3) the entire right, title and interest in and to any Letters Patent which may issue thereon in the United States or in any other country of the world and any renewals, revivals, reissues, reexaminations and extensions of the same; and

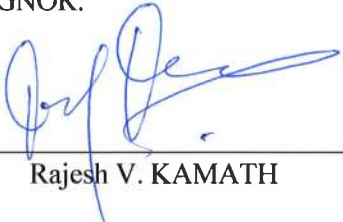
4) the entire right, title and interest in all Convention and Treaty Rights of all kinds thereon, including without limitation all rights of priority in any country of the world, in and to the above inventions, discoveries and applications.

I hereby authorize and request the competent authorities to grant and to issue any and all such Letters Patent in the United States and throughout the world to Abbott Laboratories as the assignee of the entire right, title and interest therein, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by me had this assignment, sale and transfer not been made.

I further agree, at any time, upon the request of Abbott Laboratories, to execute and to deliver to Abbott Laboratories any additional applications for patents for said inventions and discoveries, or any part or parts thereof, and any applications for patents of confirmation, registration and importation based on any Letters Patent issuing on said inventions, discoveries or applications, and divisions, continuations, renewals, revivals, reissues, reexaminations and extensions thereof.

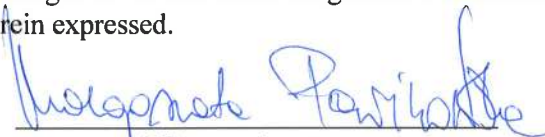
I further agree at any time to execute and to deliver upon request to Abbott Laboratories such additional documents, if any, as are necessary or desirable to secure patent protection on said inventions, discoveries and applications throughout all countries of the world, and otherwise to do the necessary to give full effect to and to perfect the rights of Abbott Laboratories under this Assignment, including the execution, delivery and procurement of any and all further documents evidencing this assignment, transfer and sale as may be necessary or desirable.

ASSIGNOR:

(1) 
Rajesh V. KAMATH

ACKNOWLEDGEMENT:

On this 2 day of April, 2012, Rajesh V. KAMATH personally appeared before me, executed the foregoing Assignment, and duly acknowledged to me that such Assignment was executed by his/her free act and deed for the uses and purposes therein expressed.


Witness signature

MALGORZATA PAWLICKA
Witness name (please print)