

MATERIALES Y MÉTODOS DE PROTEÍNAS DE UNIÓN A IL-1 BETA

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 63/297.436, presentada el 7 de enero de 2022, cuya

5 descripción se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

Esta solicitud contiene un listado de secuencias legible por computador que se ha enviado en formato de archivo XML con esta aplicación, cuyo contenido completo se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad. El
10 archivo XML del listado de secuencias presentado con esta solicitud se titula “14620-563-228_SEQ_LISTING.xml”, se creó el 1 de diciembre de 2022 y tiene un tamaño de 123.349 bytes.

1. CAMPO

La descripción se relaciona con anticuerpos anti-IL-1 β , ácidos nucleicos y
15 vectores de expresión que codifican los anticuerpos, células recombinantes que contienen los vectores y composiciones que comprenden los anticuerpos. También se proporcionan métodos para elaborar los anticuerpos y métodos para usar los anticuerpos para tratar enfermedades que incluyen el cáncer.

2. ANTECEDENTES

20 La IL-1 β es una citocina pleiotrópica con numerosas funciones tanto en estados fisiológicos como patológicos. En el cáncer, la IL-1 β facilita un microambiente de soporte tumoral a través de una variedad de mecanismos. Por ejemplo, se ha sugerido que la IL-1 β promueve la producción de especies de oxígeno reactivas mutagénicas que

pueden conducir al desarrollo tumoral. (Taniguchi K *et al*, Nat Rev Immunol.

2018;18(5):309-324.) Además, la vía IL-1 promueve la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés), dos factores proangiogénicos clave que conducen a la neo formación de capilares, un sello distintivo de la progresión tumoral y esencial para la invasividad tumoral y la metástasis. (Voronov E *et al*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(5):2645-2650; Voronov E *et al*, Front Physiol. 2014;5:114). La IL-1 β también promueve la transición epitelio-mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés) in vitro, que es una etapa crítica en la fase temprana de la cascada metastásica. (Li R *et al*, Sci Rep. 2020;10(1):377.) Dentro de la TME, la IL-1 β puede captar y reprogramar múltiples tipos celulares; por ejemplo, se ha demostrado que la IL-1 β promueve la infiltración de macrófagos y neutrófilos, moviliza poblaciones mieloides inmunosupresores (p. ej., MDSC, TAM y TAN) y amortigua la infiltración y activación de células T antitumorales (Bunt SK *et al*, J Immunol. 2006;176(1):284-290.)

Además, los datos clínicos proporcionaron evidencia de un papel importante de la vía IL-1 en el cáncer. (Ridker PM *et al*, Lancet.

2017;390(10105):1833-1842.) Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de una alta afinidad y potentes moléculas de anticuerpo anti-IL-1 β capaces de neutralizar la vía de señalización de IL-1 β para el tratamiento contra el cáncer.

3. SUMARIO

En un aspecto, en la presente descripción se proporciona un anticuerpo que se une a IL-1 β , que comprende:

(1) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, y una CDR3 de VH que tienen una secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, y una CDR3 de VH, respectivamente, de una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 7; y (ii) una VL
5 que comprende una CDR1 de VL, una CDR2 de VL, y una CDR3 de VL que tienen una secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, una CDR2 de VL, y una CDR3 de VL, respectivamente, de una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 8;

(2) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, y una CDR3 de VH que tienen una secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, y una CDR3 de VH, respectivamente, de una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 9; y (ii) una VL
10 que comprende una CDR1 de VL, una CDR2 de VL, y una CDR3 de VL que tienen una secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, una CDR2 de VL, y una CDR3 de VL, respectivamente, de una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 10; o

(3) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, y una CDR3 de VH que tienen una secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, y una CDR3 de VH, respectivamente, de una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 11; y (ii) una VL
20 que comprende una CDR1 de VL, una CDR2 de VL, y una CDR3 de VL que tienen una secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, una CDR2 de VL, y

una CDR3 de VL, respectivamente, de una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 12.

En algunas modalidades, (i) las secuencias de aminoácidos de la CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL están de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat; (ii) las secuencias de aminoácidos de la CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL están de acuerdo con el sistema de numeración de Chothia; (iii) las secuencias de aminoácidos de la CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL están de acuerdo con el sistema de numeración de AbM; (iv) las secuencias de aminoácidos de la CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL están de acuerdo con el sistema de numeración de Contact; y/o (v) las secuencias de aminoácidos de la CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL están de acuerdo con el sistema de numeración de IMGT.

En otro aspecto, en la presente descripción se proporciona un anticuerpo que se une a IL-1 β , que comprende:

- (1) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 13, sec. con núm. de ident.: 31, sec. con núm. de ident.: 49, sec. con núm. de ident.: 67, y sec. con núm. de ident.: 85; una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 14, sec. con núm. de ident.: 32, sec. con núm. de ident.: 50, sec. con núm. de ident.: 68, y sec. con núm. de ident.: 86; una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm.

de ident.: 15, sec. con núm. de ident.: 33, sec. con núm. de ident.: 51,
sec. con núm. de ident.: 69, y sec. con núm. de ident.: 87; y

(ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de
aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 16, sec. con
5 núm. de ident.: 34, sec. con núm. de ident.: 52, sec. con núm. de ident.:
70, y sec. con núm. de ident.: 88; una CDR2 de VL que tiene una
secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.:
17, sec. con núm. de ident.: 35, sec. con núm. de ident.: 53, sec. con
núm. de ident.: 71, y sec. con núm. de ident.: 89; una CDR3 de VL que
10 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm.
de ident.: 18, sec. con núm. de ident.: 36, sec. con núm. de ident.: 54,
sec. con núm. de ident.: 72, y sec. con núm. de ident.: 90;

(2) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de
aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 19, sec. con
15 núm. de ident.: 37, sec. con núm. de ident.: 55, sec. con núm. de ident.:
73, y sec. con núm. de ident.: 91; una CDR2 de VH que tiene una
secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.:
20, sec. con núm. de ident.: 38, sec. con núm. de ident.: 56, sec. con
núm. de ident.: 74, y sec. con núm. de ident.: 92; una CDR3 de VH que
20 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm.
de ident.: 21, sec. con núm. de ident.: 39, sec. con núm. de ident.: 57,
sec. con núm. de ident.: 75, y sec. con núm. de ident.: 93; y

(ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 22, sec. con núm. de ident.: 40, sec. con núm. de ident.: 58, sec. con núm. de ident.: 76, y sec. con núm. de ident.: 94; una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 23, sec. con núm. de ident.: 41, sec. con núm. de ident.: 59, sec. con núm. de ident.: 77, y sec. con núm. de ident.: 95; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 24, sec. con núm. de ident.: 42, sec. con núm. de ident.: 60, sec. con núm. de ident.: 78, y sec. con núm. de ident.: 96; o

(3) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 25, sec. con núm. de ident.: 43, sec. con núm. de ident.: 61, sec. con núm. de ident.: 79, y sec. con núm. de ident.: 97; una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 26, sec. con núm. de ident.: 44, sec. con núm. de ident.: 62, sec. con núm. de ident.: 80, y sec. con núm. de ident.: 98; una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 27, sec. con núm. de ident.: 45, sec. con núm. de ident.: 63, sec. con núm. de ident.: 81, y sec. con núm. de ident.: 99; y

(ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 28, sec. con núm. de ident.: 46, sec. con núm. de ident.: 64, sec. con núm. de ident.:

82, y sec. con núm. de ident.: 100; una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 29, sec. con núm. de ident.: 47, sec. con núm. de ident.: 65, sec. con núm. de ident.: 83, y sec. con núm. de ident.: 101; una CDR3 de VL que
 5 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 30, sec. con núm. de ident.: 48, sec. con núm. de ident.: 66, sec. con núm. de ident.: 84, y sec. con núm. de ident.: 102.

En otro aspecto, en la presente descripción se proporciona un anticuerpo que se une a IL-1 β , que comprende:

- 10 (1) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 13; una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 14; una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 15; y
- 15 (ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 16; una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 17; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 18;
- 20 (2) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 19; una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20;

una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec.
con núm. de ident.: 21; y

(ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de
aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 22; una CDR2 de VL que
5 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm.
de ident.: 23; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos
de la sec. con núm. de ident.: 24;

(3) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de
aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 25; una CDR2 de VH que
10 tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 26;
una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec.
con núm. de ident.: 27; y

(ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de
aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 28; una CDR2 de VL que
15 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm.
de ident.: 29; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos
de la sec. con núm. de ident.: 30;

(4) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de
aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 31; una CDR2 de VH que
20 tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 32;
una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec.
con núm. de ident.: 33; y

(ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 34; una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 35; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 36;

(5) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 37; una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 38; una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 39; y

(ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 40; una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 41; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 42;

(6) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 43; una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 44; una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 45; y

(ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 46; una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm.

de ident.: 47; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 48;

- (7) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 49; una CDR2 de VH que
5 tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 50; una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 51; y

- (ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 52; una CDR2 de VL que
10 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 53; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 54;

- (8) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 55; una CDR2 de VH que
15 tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 56; una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 57; y

- (ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 58; una CDR2 de VL que
20 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 59; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 60;

- (9) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 61; una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 62; una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 63; y
- (ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 64; una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 65; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 66;
- (10) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 67; una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 68; una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 69; y
- (ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 70; una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 71; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 72;
- (11) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 73; una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 74;

una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec.
con núm. de ident.: 75; y

(ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de
aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 76; una CDR2 de VL que
tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm.
de ident.: 77; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos
de la sec. con núm. de ident.: 78;

(12) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de
aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 79; una CDR2 de VH que
tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 80;
una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec.
con núm. de ident.: 81; y

(ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de
aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 82; una CDR2 de VL que
tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm.
de ident.: 83; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos
de la sec. con núm. de ident.: 84;

(13) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de
aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 85; una CDR2 de VH que
tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 86;
una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec.
con núm. de ident.: 87; y

(ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 88; una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 89; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 90;

(14) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 91; una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 92; una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 93; y

(ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 94; una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 95; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 96; o

(15) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 97; una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 98; una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 99; y

(ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 100; una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm.

de ident.: 101; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 102.

En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción comprende además una o más regiones de marco como se establece en la sec. con núm. de ident.: 7, la sec. con núm. de ident.: 8, la sec. con núm. de ident.: 9, la sec. con núm. de ident.: 10, la sec. con núm. de ident.: 11, y/o la sec. con núm. de ident.: 12.

En algunas modalidades, (i) el anticuerpo comprende una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 7, y una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 8; (ii) el anticuerpo comprende una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 9, y una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 10; o (iii) el anticuerpo comprende una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 11, y una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 12.

En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción es un anticuerpo humanizado.

En algunas modalidades, un anticuerpo proporcionado en la presente descripción es un anticuerpo IgG. En algunas modalidades, el anticuerpo IgG es un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4.

En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción comprende una cadena ligera kappa.

En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción comprende una cadena ligera lambda.

En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción comprende una región Fc mutante. En algunas modalidades, la región Fc mutante comprende mutaciones M252Y/S254T/T256E (YTE).

En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción es un anticuerpo monoclonal.

En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción es un antígeno IL-1 β .

En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción se une a un epítipo IL-1 β .

En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción se une específicamente a la IL-1 β .

En algunas modalidades, la CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL forman un sitio de unión para un antígeno de la IL-1 β .

En algunas modalidades, la CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL forman un sitio de unión para un epítipo de la IL-1 β .

En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción es multiespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción es capaz de unirse al menos a dos antígenos. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción es capaz de unirse al menos a tres antígenos. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción es capaz de unirse al menos a cuatro

antígenos. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción es capaz de unirse al menos a cinco antígenos.

En otro aspecto, en la presente descripción se proporciona una molécula que comprende el anticuerpo proporcionado en la presente descripción. En algunas
5 modalidades, el anticuerpo se fusiona genéticamente o se conjuga químicamente con un agente.

En otro aspecto, en la presente descripción se proporciona un ácido nucleico que codifica el anticuerpo proporcionado en la presente descripción.

En otro aspecto, en la presente descripción se proporciona un vector que
10 comprende el ácido nucleico proporcionado en la presente descripción.

En otro aspecto, en la presente descripción se proporciona una célula huésped que comprende el vector proporcionado en la presente descripción.

En otro aspecto, en la presente descripción se proporciona un kit que comprende el vector y el envase para este proporcionado en la presente descripción.

15 En otro aspecto, en la presente descripción se proporciona un kit que comprende el anticuerpo y el envase para este proporcionado en la presente descripción.

En otro aspecto, en la presente descripción se proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo proporcionado en la presente descripción y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

20 En otro aspecto, en la presente descripción se proporciona un método para producir la composición farmacéutica proporcionada en la presente descripción que comprende combinar el anticuerpo con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para obtener la composición farmacéutica.

En otro aspecto, en la presente descripción se proporciona un método para inhibir la señalización mediada por IL-1 β o IL-1 β en una célula, que comprende poner en contacto la célula con el anticuerpo proporcionado en la presente descripción.

En otro aspecto, en la presente descripción se proporciona un método para
5 inhibir la producción inducida de IL-1 β de IL-6, ENA-78 (CXCL5) y/o G-CSF en una célula, que comprende poner en contacto la célula con el anticuerpo proporcionado en la presente descripción.

En otro aspecto, en la presente descripción se proporciona un método para disminuir la producción de IL-6, ENA-78 (CXCL5) y/o G-CSF en una célula, que
10 comprende poner en contacto la célula con el anticuerpo proporcionado en la presente descripción.

En otro aspecto, en la presente descripción se proporciona un método que inhibe el crecimiento o la proliferación de células que expresen IL-1 β , que comprende poner en contacto las células con el anticuerpo proporcionado en la presente descripción.

15 En algunas modalidades, la célula o las células están en un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno.

En otro aspecto, en la presente descripción se proporciona un método que inhibe la IL-1 β en un sujeto, que comprende administrar al sujeto el anticuerpo proporcionado en la presente descripción.

20 En otro aspecto, en la presente descripción se proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto el anticuerpo proporcionado en la presente descripción.

En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno asociado a una IL-1 β . En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno asociado al IL-1 β es una enfermedad o trastorno inflamatorio. En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno asociado al IL-1 β es cáncer. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer de pulmón. En algunas modalidades, el cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón de células no pequeñas. En algunas modalidades, el cáncer de pulmón de células no pequeñas ha alcanzado la etapa 0, la etapa 1, la etapa 2, la etapa 3 o la etapa 4. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer de riñón. En algunas modalidades, el cáncer de riñón es un cáncer de células renales. En algunas modalidades, el cáncer de células renales ha alcanzado la etapa 1, la etapa 2 o la etapa 3.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. El mapeo de epítomos de anticuerpos seleccionados en IL-1 β usando la LC-MS basada en el intercambio de hidrógeno-deuterio. Arriba, la secuencia mostrada es el fragmento de la **sec. con núm. de ident.: 109**, los residuos 117-269 correspondientes a la secuencia de la proteína IL-1 β madura (sec. con núm. de ident.: 110). El subrayado doble indica un epítopo fuerte ($\Delta\Delta G$ tras la unión ≤ -2 kcal/mol) y el subrayado simple indica un epítopo débil ($-2 < \Delta\Delta G$ tras la unión ≤ -1 kcal/mol). Abajo, los epítomos superpuestos en la estructura cristalina de rayos X de la IL-1 β (PDB ID 1I1B). El negro indica un epítopo fuerte y gris indica un epítopo débil.

Figura 2: Potencia de 05H21A, 08F17A y 15N14A (todas con la mutación YTE en la región Fc) en un sistema indicador NF-kB/AP-1. La actividad neutralizante del panel de anticuerpos anti-IL-1 β de plomo se evaluó en células indicadoras HEK-

Blue. Se muestran las curvas de dosis-respuesta y los valores IC50 del panel de mAb anti-IL-1 β de plomo.

Figura 3: La actividad inhibidora del panel de anticuerpos de plomo anti-IL-1 β se evaluó en células de fibroblastos de pulmón humano MRC5. La figura muestra las curvas de dosis-respuesta del panel de mAb anti-IL-1 β de plomo y las determinaciones de IC50 correspondientes.

Figura 4: Potencia de 05H21A, 08F17A y 15N14A en fibroblastos de pulmón humano. La actividad neutralizante del panel de anticuerpos anti-IL-1 de plomo se evaluó en fibroblastos de pulmón humano normales (donantes de NHLF 34325 y 35234). Las figuras muestran las curvas de dosis-respuesta del donante 34325 basadas en las mediciones de liberación de IL-6 (A) y CXCL5 (B) con las correspondientes determinaciones de IC50 informadas.

Figura 5: Potencia de 05H21A, 08F17A y 15N14A en muestras de la PBMC de donantes humanos. La actividad neutralizante del panel de anticuerpo anti-IL-1 β de plomo se evaluó en la PBMC de un donante humano sano (donante TS235). (A) y (B) Curvas de dosis-respuesta que miden la liberación de IL-6 del panel de plomo y los valores IC50 calculados.

Figura 6: Potencia de 05H21A, 08F17A y 15N14A en ensayo de sangre humana. La actividad neutralizante del panel de anticuerpo anti-IL-1 β de plomo se evaluó en muestras de sangre completa humana (donantes analizados: CC00448, M3767, M5988, M7286 y M7370). Se representan gráficamente los valores de IC50 en nM basados en las mediciones de liberación de IL-6, CXCL-5 y G-CSF realizadas por MSD.

Figura 7: Potencia de 05H21A, 08F17A y 15N14A en muestras de fibroblastos de macaco cynomolgus. La actividad neutralizante del panel de anticuerpo anti-IL-1 β de plomo se evaluó en fibroblastos primarios dérmicos y pulmonares de cynomolgus (CDF y CLF, respectivamente). (A) y (B) Curvas de dosis-respuesta que miden la liberación de IL-6 del panel de plomo en CDF y CLF, respectivamente. Se muestran valores de IC50 calculados para el panel de anticuerpos anti-IL-1 β .

5

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente descripción se basa en parte en los anticuerpos novedosos que se unen a IL-1 β y las propiedades superiores de estos.

5.1. Definiciones

5 Las técnicas y procedimientos descritos o referenciados en la presente descripción incluyen aquellos que son generalmente muy entendidos y/o usados comúnmente mediante una metodología convencional por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, las metodologías ampliamente usadas y que se describen en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3.^a ed. 2001); Current
10 Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al. editores, 2003); Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic (An ed. 2009); Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols (Ed. Albitar. 2010); y Antibody Engineering Vol. 1 y 2 (Kontermann y Dübel editores, 2.^a ed. 2010). A menos que se definan de cualquier otra manera, los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo
15 significado tal como comúnmente lo entiende el experto en la técnica. Con fines de interpretar esta especificación, se aplicará la siguiente descripción de términos, y siempre que sea apropiado, los términos usados en singular también incluyen el plural y viceversa. En el caso de que cualquier descripción de un término establecido entre en conflicto con algún documento incorporado como referencia en la presente
20 descripción, prevalecerá la descripción del término que se expone a continuación.

El término “anticuerpo”, “inmunoglobulina” o “Ig” se usa indistintamente en la presente descripción y se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales (que incluyen anticuerpos agonistas, antagonistas,

neutralizantes, anticuerpos monoclonales completos o intactos), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica o monoepitópica, anticuerpos policlonales o monovalentes, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (*p. ej.*, anticuerpos biespecíficos siempre que muestren la actividad biológica deseada),

5 formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos de cadena simple y fragmentos de estos (*p. ej.*, anticuerpos de dominio), como se describe a continuación. Un anticuerpo puede ser humano, humanizado, quimérico y/o madurado por afinidad, así como un anticuerpo de otras especies, por ejemplo, ratón, conejo, llama, *etc.* El término “anticuerpo” pretende incluir un producto polipeptídico de células B dentro de

10 la clase de polipéptidos de inmunoglobulina que es capaz de unirse a un antígeno molecular específico y está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, en donde cada par tiene una cadena pesada (aproximadamente 50-70 kDa) y una cadena ligera (aproximadamente 25 kDa), cada porción aminoterminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a aproximadamente

15 130 o más aminoácidos, y cada porción carboxiterminal de cada cadena incluye una región constante. Ver, *p. ej.*, Antibody Engineering (Borrebaeck ed., segunda ed. 1995); y Kubly, Immunology (3.^a ed. 1997). Los anticuerpos también incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos sintéticos, anticuerpos producidos de manera recombinante, anticuerpos que incluyen las especies Camelidae (*p. ej.*, llama o alpaca) o sus

20 variantes humanizados, intracuerpos, anticuerpos antiidiotipos (anti-Id) y fragmentos funcionales (*p. ej.*, fragmentos de unión al antígeno) de cualquiera de los anteriores, que se refieren a una porción de un polipéptido de cadena pesada o ligera de anticuerpo que retiene algo o la totalidad de la actividad de unión del anticuerpo del

cual se deriva el fragmento. Los ejemplos no limitantes de fragmentos funcionales (p. ej., fragmentos de unión al antígeno) incluyen Fv de cadena simple (scFv) (p. ej., incluyen monoespecíficos, biespecíficos, etc.), fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos F(ab)₂, fragmentos F(ab')₂, Fv unidos a disulfuro (dsFv), fragmentos Fd, fragmentos Fv, diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo y minicuerpo. En particular, los anticuerpos proporcionados en la presente descripción incluyen moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, por ejemplo, dominios o moléculas de unión a antígenos que contienen un sitio de unión al antígeno que se une a un antígeno (p. ej., una o más CDR de un anticuerpo). Tales fragmentos de anticuerpo pueden encontrarse, por ejemplo, en Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (1989); Mol. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (Myers ed., 1995); Huston *et al.*, 1993, Cell Biophysics 22:189-224; Plückthun y Skerra, 1989, Meth. Enzymol. 178:497-515; y Day, Advanced Immunochemistry (2.^a ed. 1990). Los anticuerpos proporcionados en la presente descripción pueden ser de cualquier clase (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o cualquier subclase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) de la molécula de inmunoglobulina. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos agonistas o anticuerpos antagonistas. Los anticuerpos pueden no ser agonistas ni antagonistas.

Un “antígeno” es una estructura a la cual un anticuerpo puede unirse selectivamente. Un antígeno objetivo puede ser un polipéptido, carbohidrato, ácido nucleico, lípido, hapteno u otro compuesto de origen natural o sintético. En algunas modalidades, el antígeno objetivo es un polipéptido. En ciertas modalidades, un antígeno se asocia con una célula, por ejemplo, que está presente en o sobre una célula.

Un anticuerpo “intacto” es aquel que comprende un sitio de unión al antígeno así como un CL y al menos regiones constantes de cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Las regiones constantes pueden incluir regiones constantes humanas o variantes de secuencia de aminoácidos de estas. En ciertas modalidades, un anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Los términos “se une” o “unión” se refieren a una interacción entre moléculas que incluyen, por ejemplo, formar un complejo. Las interacciones pueden ser, por ejemplo, interacciones no covalentes que incluyen enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, interacciones hidrófobas y/o interacciones de Van der Waals. Un complejo puede también incluir la unión de dos o más moléculas que se mantienen unidas mediante enlaces covalentes o no covalentes, interacciones o fuerzas. La resistencia de las interacciones no covalentes totales entre un sitio de unión al antígeno único en un anticuerpo y un epítipo único de una molécula diana, tal como un antígeno, es la afinidad del anticuerpo o fragmento funcional para ese epítipo. La relación del índice de disociación (k_{inactiva}) al índice de asociación (k_{activa}) de una molécula de unión (*p. ej.*, un anticuerpo) con un antígeno monovalente ($k_{\text{inactiva}}/k_{\text{activa}}$) es la constante de disociación K_D , que está inversamente relacionada con la afinidad. Cuanto menor es el valor de K_D , mayor es la afinidad del anticuerpo. El valor de K_D varía para diferentes complejos de anticuerpo y antígeno y depende del k_{activa} y k_{inactiva} . La constante de disociación K_D para un anticuerpo proporcionado en la presente descripción puede determinarse mediante cualquier método proporcionado en la presente descripción o cualquier otro método conocido por los expertos en la técnica. La afinidad en un sitio de unión no siempre refleja la verdadera fuerza de la

interacción entre un anticuerpo y un antígeno. Cuando los antígenos complejos que contienen múltiples determinantes antigénicos repetitivos, tales como un antígeno polivalente, entran en contacto con anticuerpos que contienen múltiples sitios de unión, la interacción del anticuerpo con el antígeno en un sitio aumentará la

5 probabilidad de una reacción en un segundo sitio. La fuerza de tales interacciones múltiples entre un anticuerpo multivalente y el antígeno se denomina avidéz.

En relación con las moléculas de unión descritas en la presente descripción, términos tales como “unirse a”, “que se une específicamente a” y términos análogos se usan, además, indistintamente en la presente descripción y se refieren a moléculas de unión de dominios de unión al antígeno que se unen específicamente a un antígeno, tal como un polipéptido. Una molécula de unión o dominio de unión al antígeno que se une a, o se une específicamente a, un antígeno puede identificarse, por ejemplo, mediante inmunoensayos, Octet®, Biacore®, u otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica. En algunas modalidades, una molécula de unión o dominio de unión al antígeno se une a o se une específicamente a un antígeno cuando se une a un antígeno con mayor afinidad que a cualquier antígeno de reacción cruzada como se determina usando técnicas experimentales, tales como radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés) y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés). Típicamente, una reacción específica o selectiva será al menos dos veces la señal de fondo o ruido y puede ser más de 10 veces de fondo. Ver, *p. ej.*, Fundamental Immunology 332-36 (Paul ed., segunda edición, 1989) para un debate con respecto a la especificidad de unión. En ciertas modalidades, el grado de unión de una molécula de unión o dominio de unión al antígeno a una proteína “no objetivo” es

menor que aproximadamente el 10 % de la unión de la molécula de unión o dominio de unión al antígeno a su antígeno objetivo particular, por ejemplo, como se determina mediante el análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés) o RIA. Una molécula de unión o dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno incluye uno que es capaz de unirse al antígeno con afinidad suficiente de manera que la molécula de unión sea útil, por ejemplo, como un agente terapéutico y/o diagnóstico para dirigir el antígeno. En ciertas modalidades, una molécula de unión o dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno tiene una constante de disociación (K_D) menor que o igual a 1 μ M, 800 nM, 600 nM, 550 nM, 500 nM, 300 nM, 250 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,9 nM, 0,8 nM, 0,7 nM, 0,6 nM, 0,5 nM, 0,4 nM, 0,3 nM, 0,2 nM o 0,1 nM. En ciertas modalidades, una molécula de unión o dominio de unión al antígeno se une a un epítipo de un antígeno conservado entre el antígeno de diferentes especies.

En ciertas modalidades, las moléculas de unión o dominios de unión al antígeno pueden comprender secuencias “quiméricas” en las cuales una porción de la cadena pesada y/o cadena ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es (son) idéntica(s) con u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (ver la patente de los EE. UU. núm. 4.816.567; y Morrison

et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-55). Las secuencias quiméricas pueden incluir secuencias humanizadas.

En ciertas modalidades, las moléculas de unión o dominios de unión al antígeno pueden comprender porciones de formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (*p. ej.*, camélidos, murinos, primate no humano) que incluyen secuencias de inmunoglobulinas humanas (*p. ej.*, anticuerpo receptor) en el cual los residuos de CDR nativos se reemplazan por residuos de la CDR correspondiente de una especie no humana (*p. ej.*, anticuerpo donante) tal como camélido, ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, uno o más residuos de región FR de las secuencias de inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. Una cadena pesada o ligera de anticuerpo humanizado puede comprender sustancialmente todas al menos una o más regiones variables, en las cuales todas o sustancialmente todas las CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. En ciertas modalidades, el anticuerpo humanizado comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, ver Jones *et al.*, Nature 321: 522-25 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332: 323-29 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-96 (1992); Carter, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-89 (1992); las patentes de los EE. UU. núms.: 6.800.738; 6.719.971; 6.639.055; 6.407.213; y 6.054.297.

En ciertas modalidades, las moléculas de unión o dominios de unión al antígeno pueden comprender porciones de un “anticuerpo completamente humano” o “anticuerpo humano”, en donde los términos se usan indistintamente en la presente descripción y se refieren a un anticuerpo que comprende una región variable humana y, por ejemplo, una región constante humana. Las moléculas de unión pueden comprender una secuencia de anticuerpo. En modalidades específicas, los términos se refieren a un anticuerpo que comprende una región variable y una región constante de origen humano. En ciertas modalidades, los anticuerpos “completamente humanos” pueden abarcar, además, anticuerpos que unen polipéptidos y están codificados por secuencias de ácido nucleico que son variantes somáticas de origen natural de la secuencia de ácido nucleico de inmunoglobulina de línea germinal humana. El término “anticuerpo completamente humano” incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes correspondientes a secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana como describen Kabat *et al.* (Ver Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, publicación de NIH, núm. 91-3242). Un “anticuerpo humano” es aquel que posee una secuencia de aminoácido que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha elaborado mediante cualquiera de las técnicas para elaborar anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando varias técnicas conocidas en la técnica, que incluyen genotecas de exhibición de fagos (Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581 (1991)) y genotecas de exhibición de levadura (Chao *et*

al., Nature Protocols 1: 755-68 (2006)). Están también disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos los métodos descritos en Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy 77 (1985); Boerner *et al.*, J. Immunol. 147(1):86-95 (1991); y van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001). Los anticuerpos

5 humanos pueden prepararse mediante la administración del antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir tales anticuerpos en respuesta al desafío antigénico, pero cuyos locus endógenos han sido desactivados, *p. ej.*, ratones (*ver, p. ej.*, Jakobovits, Curr. Opin. Biotechnol. 6(5):561-66 (1995); Brüggemann and Taussing, Curr. Opin. Biotechnol. 8(4):455-58 (1997); y la patente de los EE. UU. núms. 6.075.181 y

10 6.150.584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE™). Ver también, por ejemplo, Li *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 3557-62 (2006) con respecto a los anticuerpos humanos generados a través de una tecnología de hibridoma de células B humanas.

En ciertas modalidades, las moléculas de unión o dominios de unión al antígeno pueden comprender porciones de un “anticuerpo humano recombinante”, en

15 donde la frase incluye anticuerpos humanos que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped, anticuerpos aislados de una genoteca de anticuerpos humanos combinatoriales y recombinantes, anticuerpos aislados de un animal (*p. ej.*, un ratón o vaca) que es transgénico y/o transcromosomal para genes

20 de inmunoglobulina humana (*ver, p. ej.*, Taylor, L. D. *et al.*, Nucl. Acids Res. 20:6287-6295 (1992)) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implica el corte y empalme de las secuencias génicas de inmunoglobulinas humanas a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes pueden

tener regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (ver Kabat, E. A. *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, publicación de NIH, núm. 91-3242). En ciertas modalidades, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, si bien derivan de, y se relacionan con, secuencias de VH y VL de línea germinal humana, no existen naturalmente dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpo humano *in vivo*.

En ciertas modalidades, las moléculas de unión o dominios de unión al antígeno pueden comprender una porción de un “anticuerpo monoclonal”, en donde el término, como se usa en la presente descripción, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, *p. ej.*, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores o modificaciones postraduccionales muy conocidas, tales como isomerización o desamidación de aminoácidos, oxidación de metionina o desamidación de asparagina o glutamina, cada anticuerpo monoclonal reconocerá, típicamente, un solo epítipo en el antígeno. En modalidades específicas, un “anticuerpo monoclonal”, como se usa en la presente descripción, es un anticuerpo producido por un hibridoma único u otra célula. El término “monoclonal” no se limita a cualquier método particular para elaborar el anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos

monoclonales útiles en la presente descripción pueden prepararse mediante la metodología de hibridoma descrita primero por Kohler *et al.*, Nature 256: 495 (1975), o pueden prepararse usando métodos de ADN recombinante en células vegetales o animales bacterianas o eucariotas (*ver, p. ej.*, patente de los EE. UU. núm.

- 5 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también pueden aislarse de genotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, Nature 352: 624-28 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581-97 (1991), por ejemplo. Otros métodos para la preparación de líneas celulares clonales y de anticuerpos monoclonales expresados son, por lo tanto, muy conocidos en la técnica. *Ver, p. ej.*,
 10 Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.* editores, 5.^a ed. 2002).

Una unidad de anticuerpo de 4 cadenas típica es una glicoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas es generalmente de aproximadamente 150.000 daltons. Cada cadena L se une a una cadena H mediante
 15 un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H se unen entre sí mediante uno o más enlaces disulfuro que dependen del isotipo de cadena H. Cada cadena H y L también tienen puentes de disulfuro intracadena regularmente espaciados. Cada cadena H tiene en el extremo N, un dominio variable (VH) seguido por tres dominios constantes (CH) para cada una de las cadenas α e γ y cuatro dominios CH para isotipos μ y ϵ . Cada
 20 cadena L tiene en el extremo N, un dominio variable (VL) seguido por un dominio constante (CL) en su otro extremo. El VL está alineado con el VH, y el CL está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (CH1). Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena

ligera y cadena pesada. El emparejamiento de un VH y VL juntos forma un sitio de unión al antígeno único. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, ver, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology 71 (Stites, *et al.* eds., octava edición, 1994); e Immunobiology (Janeway *et al.* Editores, 5.^a ed. 2001).

5 El término “Fab” o “región Fab” se refiere a una región de anticuerpo que se une al antígeno. Una IgG convencional comprende, usualmente, dos regiones Fab, cada una de las cuales reside en uno de los dos brazos de la estructura de IgG en forma de Y. Cada región Fab se compone, típicamente, de una región variable y una región constante de cada una de las cadenas pesada y ligera. Más específicamente, la región
10 variable y la región constante de la cadena pesada en una región Fab son regiones VH y CH1, y la región variable y la región constante de la cadena ligera en una región Fab son regiones VL y CL. Las VH, CH1, VL y CL en una región Fab pueden disponerse de varias maneras para conferir una capacidad de unión al antígeno de acuerdo con la presente descripción. Por ejemplo, las regiones VH y CH1 puede estar en un polipéptido, y las
15 regiones VL y CL pueden estar en un polipéptido separado, de manera similar a una región Fab de una IgG convencional. Alternativamente, las regiones VH, CH1, VL y CL pueden estar en el mismo polipéptido y orientadas en diferentes órdenes, como se describe en mayor detalle en las secciones a continuación.

El término “región variable”, “dominio variable”, “región V” o “dominio V” se
20 refiere a una porción de las cadenas ligera o pesada de un anticuerpo que, generalmente, se ubica en el extremo amino-terminal de la cadena ligera o pesada y tiene una longitud de aproximadamente 120 a 130 aminoácidos en la cadena pesada y aproximadamente 100 a 110 aminoácidos en la cadena ligera, y se usa en la unión y

especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. La región variable de cadena pesada puede mencionarse como “VH”. La región variable de cadena ligera puede mencionarse como “VL”. El término “variable” se refiere al hecho de que ciertos segmentos de las regiones variables difieren extensamente en secuencia entre los anticuerpos. La región V media la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través del tramo de 110 aminoácidos de las regiones variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos menos variables (p. ej., relativamente invariantes) llamados regiones marco (FR, por sus siglas en inglés) de aproximadamente 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de mayor variabilidad (p. ej., variabilidad extrema) llamadas “regiones hipervariables”, que tienen cada una aproximadamente 9-12 aminoácidos de longitud. Las regiones variables de cadenas pesada y ligera comprenden cada una cuatro FR, que adoptan ampliamente una configuración de lámina β , conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (*ver, p. ej., Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (quinta edición, 1991))*). Las regiones constantes no se involucran directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Las regiones variables difieren

extensamente en secuencias entre diferentes anticuerpos. En modalidades específicas, la región variable es una región variable humana.

El término “numeración de residuos de región variable de acuerdo con Kabat” o “numeración de posición de aminoácidos como en Kabat”, y variaciones de estos, se refiere al sistema de numeración usado para regiones variables de cadena pesada o regiones variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, *supra*. Con el uso de este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o más aminoácidos correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una única inserción de aminoácidos (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 y tres residuos insertados (p. ej., residuos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del residuo 82. La numeración de residuos de Kabat puede determinarse para un anticuerpo dado mediante la alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada según Kabat “estándar”. El sistema de numeración de Kabat se usa generalmente cuando se refiere a un residuo en el dominio variable (aproximadamente residuos 1-107 de la cadena ligera y residuos 1-113 de la cadena pesada) (p. ej., Kabat *et al.*, *supra*). El “sistema de numeración de la EU” o “índice de la EU” se usa generalmente para referirse a un residuo en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (p. ej., el índice de la EU indicado en Kabat *et al.*, *supra*). El “índice de la UE como en Kabat” se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo humano IgG 1 de la UE. Otros sistemas de numeración han sido descritos, por ejemplo, por AbM, Chothia, Contact, IMGT y AHon.

El término “cadena pesada”, cuando se usa con referencia a un anticuerpo, se refiere a una cadena polipeptídica de aproximadamente 50-70 kDa, en donde la porción amino-terminal incluye una región variable de aproximadamente 120 a 130 o más aminoácidos, y una porción carboxi-terminal incluye una región constante. La región

5 constante puede ser aquella de cinco tipos distintos (p. ej., isotipos) denominados alfa (α), delta (δ), épsilon (ϵ), gamma (γ), y mu (μ), basada en la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada. Las distintas cadenas pesadas difieren en tamaño: α , δ e γ contienen aproximadamente 450 aminoácidos, mientras que μ y ϵ contienen aproximadamente 550 aminoácidos. Cuando se combinan con una cadena

10 ligera, estos distintos tipos de cadenas pesadas dan lugar a cinco clases bien conocidas (p. ej., isotipos) de anticuerpos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, que incluyen cuatro subclases de IgG, específicamente IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

El término “cadena ligera”, cuando se usa con referencia a un anticuerpo, se refiere a una cadena de polipéptidos de aproximadamente 25 kDa, en donde la

15 porción amino-terminal incluye una región variable de aproximadamente 100 a aproximadamente 110 o más aminoácidos, y una porción carboxi-terminal incluye una región constante. La longitud aproximada de una cadena ligera es de 211 a 217 aminoácidos. Existen dos tipos distintos, denominados kappa (κ) o lambda (λ) basados en la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes.

20 Como se usa en la presente descripción, los términos “región hipervariable”, “HVR”, “región determinante de complementariedad” y “CDR” se usan indistintamente. Una “CDR” se refiere a una de tres regiones hipervariables (H1, H2 o H3) dentro de la región no estructural de la estructura de hoja- β de VH de la inmunoglobulina (Ig o

anticuerpo) o una de tres regiones hipervariables (L1, L2 o L3) dentro de la región no estructural de la estructura de hoja- β de VL del anticuerpo. CDR1, cDR2 y CDR3 en el dominio VH también se denominan HCDR1, hCDR2 y HCDR3, respectivamente. CDR1, cDR2 y CDR3 en el dominio V también se denominan LCDR1, lCDR2 y LCDR3, respectivamente. En consecuencia, las CDR son secuencias de región variable intercaladas dentro de las secuencias de región estructural.

Las regiones CDR son bien conocidas por los expertos en la técnica y han sido definidas por sistemas de numeración muy conocidos. Por ejemplo, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de Kabat están basadas en la variabilidad de la secuencia y son las más comúnmente usadas (ver, p. ej., Kabat *et al.*, *supra*). Jia et al., J Immunol 2010: 184:5696-5704). Chothia se refiere en su lugar a la ubicación de los bucles estructurales (ver, p. ej., Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-17 (1987)). El extremo del bucle de CDR-H1 de Chothia, cuando se numera usando la convención de numeración de Kabat, varía entre H32 y H34 dependiendo de la longitud del bucle (esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat coloca las inserciones en H35A y H35B; si ni 35A ni 35B están presentes, el bucle termina en 32; si solo está presente 35A, el bucle termina en 33; si 35A y 35B están presentes, el bucle termina en 34). Las regiones hipervariables de AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son usadas por el software de modelado de anticuerpos de AbM de Oxford Molecular (ver, p. ej., Antibody Engineering Vol. 2 (Kontermann y Dübel eds., segunda ed. 2010)). Las regiones hipervariables de “contacto” están basadas en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Otro sistema de numeración universal desarrollado y adoptado ampliamente

es ImMunoGeneTics (IMGT) Information System® (Lafranc *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.* 27(1):55-77 (2003)). IMGT es un sistema integrado de información especializado en inmunoglobulinas (IG), receptores de células T (TR) y el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de humanos y otros vertebrados. En la presente descripción,

5 se hace referencia a las CDR en términos de secuencia de aminoácidos y la ubicación dentro de la cadena ligera o pesada. Debido a que la “ubicación” de las CDR dentro de la estructura del dominio variable de la inmunoglobulina se conserva entre las especies y se encuentra presente en estructuras denominadas bucles, usando sistemas de numeración que alinean secuencias de dominio variable de acuerdo con características

10 estructurales, los residuos de marco y CDR y se identifican fácilmente. Esta información puede usarse en el injerto y reemplazo de residuos de CDR de inmunoglobulinas de una especie en una estructura aceptora, típicamente, de un anticuerpo humano. Un sistema de numeración adicional (AHon) ha sido desarrollado por Honegger y Plückthun, *J. Mol. Biol.* 309: 657-70 (2001). La correspondencia entre el sistema de numeración, que

15 incluye, por ejemplo, la numeración de Kabat y el sistema de numeración único de IMGT, es muy conocida por un experto en la técnica (*ver, p. ej., Kabat, supra; Chothia y Lesk, supra; Martin, supra; Lefranc et al., supra*). Los residuos de cada una de estas regiones hipervariables o CDR se ejemplifican en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1. CDR ilustrativas de acuerdo con varios sistemas de numeración

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contact	IMGT
CDR L1	L24--L34	L24--L34	L26--L32 o L24--L34	L30--L36	L27--L38
CDR L2	L50--L56	L50--L56	L50--L52 o L50--L56	L46--L55	L56--L65

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contact	IMGT
CDR L3	L89--L97	L89--L97	L91--L96 o L89--L97	L89--L96	L105--L117
CDR H1	H31--H35B (Numeración de Kabat)	H26--H35B	H26--H32..34	H30--H35B	H27--H38
CDR H1	H31--H35 (Numeración de Chothia)	H26--H35	H26--H32	H30--H35	
CDR H2	H50--H65	H50--H58	H53--H55 o H52--H56	H47--H58	H56--H65
CDR H3	H95--H102	H95--H102	H96--H101 o H95--H102	H93--H101	H105-H117

Los límites de una CDR dada pueden variar dependiendo del esquema usado

para la identificación. Por consiguiente, a menos que se especifique de cualquier otra manera, los términos “CDR” y “región determinante complementaria” de un anticuerpo determinado o región de este, tal como una región variable, así como las CDR individuales (p. ej., CDR-H1, CDR-H2) del anticuerpo o región de este, debe entenderse que abarcan la región determinante complementaria como se define por cualquiera de los esquemas conocidos descritos anteriormente en la presente descripción. En algunos casos, se especifica el esquema para identificar una CDR o CDR particulares, tal como la CDR definida por el método IMGT, Kabat, Chothia, o de Contact. En otros casos, se proporciona la secuencia de aminoácidos particular de una CDR. Cabe señalar que las regiones CDR pueden definirse además por una combinación de varios sistemas de numeración, p. ej., una combinación de sistemas de numeración de Kabat y Chothia, o una combinación de sistemas de numeración de Kabat e IMGT. Por lo tanto, el término tal como “una CDR como se expone en una VH específica” incluye cualquier CDR1 como se define por los sistemas de numeración de CDR ilustrativos descritos anteriormente, pero no se limita a

estos. Una vez que se proporciona una región variable (*p. ej.*, una VH o VL), los expertos en la técnica entenderán que las CDR dentro de la región pueden definirse por diferentes sistemas de numeración o combinaciones de estos.

Las regiones hipervariables pueden comprender “regiones hipervariables extendidas” de la siguiente manera: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 o 89-96 (L3) en la VL, y 26-35 o 26-35A (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en la VH.

El término “región constante” o “dominio constante” se refiere a una porción del extremo carboxi terminal de la cadena ligera y pesada que no está implicada directamente en la unión del anticuerpo al antígeno pero que exhibe diversas funciones efectoras, tales como la interacción con el receptor Fc. Los términos se refieren a la porción de una molécula de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos más conservada con respecto a la otra porción de la inmunoglobulina, la región variable, que contiene el sitio de unión al antígeno. La región constante puede contener las regiones CH1, CH2 y CH3 de la cadena pesada y la región CL de la cadena ligera.

El término “marco” o “FR” (por sus siglas en inglés) se refiere a los residuos de la región variable que flanquean las CDR. Los residuos de FR están presentes, por ejemplo, en anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos, de dominio, diacuerpos, anticuerpos lineales y anticuerpos biespecíficos. Los residuos de FR son aquellos residuos de dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable o residuos de CDR.

El término “región Fc”, en la presente descripción, se usa para definir una región de extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye, por ejemplo, regiones Fc de secuencia nativa, regiones Fc recombinantes y regiones Fc

variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina podrían variar, la región Fc de cadena pesada de la IgG humana se define, frecuentemente, como tramo desde un residuo de aminoácidos en la posición Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxilo-terminal de esta. La lisina de extremo C (residuo 447 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la producción o la purificación del anticuerpo, o mediante el diseño recombinante del ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. En consecuencia, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los residuos K447 eliminados, poblaciones de anticuerpos sin residuos K447 eliminados y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447. Un “región Fc funcional” posee una “función efectora” de una secuencia nativa de la región Fc. Las “funciones efectoras” ilustrativas incluyen la unión a C1q; CDC; unión de receptor Fc; ADCC; fagocitosis; regulación en descenso de los receptores de superficie celular (*p. ej.*, receptor de células B), etc. Tales funciones efectoras requieren generalmente que la región Fc se combine con una región de unión o dominio de unión (*p. ej.*, una región o dominio variable de anticuerpo) y pueden evaluarse usando varios ensayos conocidos por los expertos en la técnica. Una “región Fc variante” comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácidos (*p. ej.*, mediante sustitución, adición o delección). En ciertas modalidades, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, o de

aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa en la región Fc de un polipéptido parental. En la presente descripción, la región Fc variante puede tener al menos aproximadamente 80 % de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental, o al menos aproximadamente 90 % de homología con esta, por ejemplo, al menos aproximadamente 95 % de homología con esta.

Como se usa en la presente descripción, un “epítopo” es un término en la técnica y se refiere a una región localizada de un antígeno al cual un anticuerpo puede unirse específicamente. Un epítopo puede ser un epítopo lineal o un epítopo conformacional, no lineal o discontinuo. En el caso de un antígeno de polipéptido, por ejemplo, un epítopo puede ser aminoácidos contiguos del polipéptido (un epítopo “lineal”) o un epítopo puede comprender aminoácidos a partir de dos o más regiones no contiguas del polipéptido (un epítopo “conformacional”, “no lineal” o “discontinuo”). Un experto en la técnica apreciará que, generalmente, un epítopo lineal puede o no ser dependiente de una estructura secundaria, terciaria o cuaternaria. Por ejemplo, en algunas modalidades, una molécula de unión se une a un grupo de aminoácidos independientemente de si están plegados en una estructura de proteína tridimensional natural. En otras modalidades, una molécula de unión requiere residuos de aminoácidos que hacen que el epítopo exhiba una conformación particular (p. ej., flexión, torsión, giro o pliegue) para reconocer y unir el epítopo.

“Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” y “homología” con respecto a un péptido, polipéptido o secuencia de anticuerpo se definen como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a

los residuos de aminoácidos en la secuencia peptídica o polipeptídica específica, después de alinear las secuencias e introducir interrupciones, de ser necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con fines de

5 determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos públicamente disponibles, tales como programas BLAST, BLAST-2, ALIGN o MEGALIGN™ (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluido cualquier algoritmo necesario

10 para lograr la alineación máxima en toda la longitud de las secuencias que se comparan.

El término “especificidad” se refiere al reconocimiento selectivo de una proteína de unión al antígeno para un epítipo particular de un antígeno. Los anticuerpos naturales, por ejemplo, son monoespecíficos. El término “multiespecífico”, como se usa en la presente descripción, indica que una proteína de

15 unión al antígeno tiene dos o más sitios de unión al antígeno de los cuales al menos dos se unen a antígenos diferentes. “Biespecífico”, como se usa en la presente descripción, indica que una proteína de unión al antígeno tiene dos especificidades de unión al antígeno diferentes. El término anticuerpo “monoespecífico” como se usa en la presente descripción indica una proteína de unión al antígeno que tiene uno o más

20 sitios de unión, cada uno de los cuales se une al mismo antígeno.

El término “valente”, como se usa en la presente descripción, indica la presencia de una cantidad especificada de sitios de unión en una proteína de unión al antígeno. Un anticuerpo natural, por ejemplo, o un anticuerpo completo, tiene dos sitios

de unión y es bivalente. Como tales, los términos “trivalente”, “tetraivalente”, “pentavalente” y “hexavalente” denotan la presencia de dos sitios de unión, tres sitios de unión, cuatro sitios de unión, cinco sitios de unión y seis sitios de unión, respectivamente, en una proteína de unión al antígeno.

5 Los términos “polipéptido” y “péptido” y “proteína” pueden usarse indistintamente en la presente descripción para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede ser interrumpido por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se modificó naturalmente o por
10 intervención; por ejemplo, la formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación. Dentro de la definición también se incluyen, por ejemplo, los polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido, que incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos no naturales, así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que, debido a que los
15 polipéptidos de esta descripción pueden basarse en anticuerpos u otros miembros de la superfamilia de inmunoglobulina, en ciertas modalidades, un “polipéptido” puede ocurrir como una cadena única o como dos o más cadenas asociadas.

 “Polinucleótido” o “ácido nucleico”, tal como se usa indistintamente en la presente descripción, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e
20 incluye ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero mediante la polimerasa de ADN o ARN o mediante una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales

como nucleótidos metilados y sus análogos. “Oligonucleótido”, tal como se usa en la presente descripción, se refiere a polinucleótidos cortos, generalmente monocatenarios, sintéticos, que tienen generalmente, pero no necesariamente, menos de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Los términos “oligonucleótido” y “polinucleótido” no se excluyen mutuamente. La descripción anterior para los polinucleótidos es aplicable, por igual y plenamente, para los oligonucleótidos. Una célula que produce una molécula de unión de la presente descripción puede incluir una celular de hibridoma parental, así como células huésped bacterianas y eucariotas en las que se han introducido ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos. A menos que se especifique de cualquier otra manera, el extremo izquierdo de cualquier secuencia de polinucleótidos monocatenaria descrita en la presente descripción es el extremo 5'; la dirección izquierda de la secuencias de polinucleótidos bicatenarias se denomina dirección 5'. La dirección de la adición de 5' a 3' de transcritos de ARN incipientes se denomina la dirección de transcripción; las regiones de secuencia en la cadena de ADN que tiene la misma secuencia que el transcrito de ARN, que son 5' al extremo 5' del transcrito de ARN se denomina “secuencias corriente arriba”; las regiones de secuencia en la cadena de ADN que tiene la misma secuencia que el transcrito de ARN que son 3' al extremo 3' del transcrito de ARN se denominan “secuencias corriente abajo”.

Un “ácido nucleico aislado” es un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN, ADN o una mezcla de ácidos nucleicos, que está sustancialmente separado de otras secuencias de ADN de genoma, así como proteínas o complejos tales como los ribosomas y polimerasas, que naturalmente acompañan a una secuencia nativa. Una molécula de ácido nucleico “aislada” es aquella que está separada de otras moléculas

de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural de la molécula de ácido nucleico. Además, una molécula de ácido nucleico “aislada”, tal como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material celular o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de

5 precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetiza químicamente.

En una modalidad específica, una o más moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo como se describe en la presente descripción están aisladas o purificadas. El término abarca las secuencias de ácido nucleico que se han extraído de su ambiente de origen natural, e incluyen aislados de ADN recombinante o clonado y análogos

10 químicamente sintetizados o análogos biológicamente sintetizados por sistemas heterólogos. Una molécula sustancialmente pura puede incluir formas aisladas de la molécula. Específicamente, una molécula de ácido nucleico “aislada” que codifica un CAR descrito en la presente descripción es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la

15 cual se asocia normalmente en el ambiente en el que se produjo.

A menos que se especifique de cualquier otra manera, una “secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos” incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones redundantes entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. La secuencia de nucleótidos de frase que codifica una

20 proteína o un ARN también puede incluir intrones en la medida en que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína pueda contener en alguna versión uno(s) intrón(es).

El término “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un

organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente, una secuencia operadora y un sitio de unión al ribosoma. Se conoce que las células eucariotas usan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

5 Como se usa en la presente descripción, el término “unido operativamente” y frases similares (p. ej., se fusiona genéticamente), cuando se usan en referencia a ácidos nucleicos o aminoácidos, se refieren al enlace operativo de secuencias de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos, respectivamente, colocadas en relaciones funcionales entre sí. Por ejemplo, un promotor, elementos potenciadores, marco de
10 lectura abierto, UTR 5' y 3' y secuencias terminadoras unidos operativamente resultan en la producción precisa de una molécula de ácido nucleico (p. ej., ARN). En algunas modalidades, los elementos de ácido nucleico unidos operativamente resultan en la transcripción de un marco de lectura abierto y, en última instancia, la producción de un polipéptido (es decir, la expresión del marco de lectura abierto). Como otro ejemplo, un
15 péptido operativamente unido es aquel en el cual los dominios funcionales se colocan con una distancia adecuada entre sí para impartir la función prevista de cada dominio.

 El término “vector” se refiere a una sustancia que se usa para transportar o incluir una secuencia de ácido nucleico, que incluye, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de unión (p. ej., un anticuerpo) como se
20 describe en la presente descripción, para introducir una secuencia de ácido nucleico en una célula huésped. Los vectores aplicables para usarse incluyen, por ejemplo, vectores de expresión, plásmidos, vectores de fagos, vectores virales, episomas y cromosomas artificiales, que pueden incluir secuencias de selección o marcadores operables para una

integración estable en un cromosoma de la célula huésped. Adicionalmente, los vectores pueden incluir uno o más genes marcadores seleccionables y secuencias de control de expresión apropiadas. Los genes marcadores seleccionables que pueden incluirse, por ejemplo, proporcionan resistencia a antibióticos o toxinas, complementan deficiencias auxotróficas o suministran nutrientes críticos que no están en los medios de cultivo. Las secuencias de control de expresión pueden incluir promotores constitutivos e inducibles, potenciadores de transcripción, terminadores de transcripción y lo similar, que son muy conocidos en la técnica. Cuando dos o más moléculas de ácido nucleico se coexpresarán (p. ej., tanto una cadena pesada y una cadena ligera del anticuerpo como un VH y VL del anticuerpo), ambas moléculas de ácido nucleico pueden insertarse, por ejemplo, en un vector de expresión único o en vectores de expresión separados. Para el vector de expresión único, los ácidos nucleicos codificantes puedan estar operativamente unidos a una secuencia de control de expresión común o ligados a diferentes secuencias de control de expresión, tales como un promotor inducible y un promotor constitutivo. La introducción de las moléculas de ácido nucleico en una célula huésped puede confirmarse mediante métodos muy conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, por ejemplo, el análisis de ácido nucleico tal como la membrana de Northern o la ampliación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ARNm, inmunotransferencia para la expresión de productos génicos u otros métodos analíticos adecuados para probar la expresión de una secuencia de ácido nucleico introducida o su correspondiente producto génico. Un experto en la técnica entenderá que las moléculas de ácido nucleico se expresan en una cantidad suficiente para producir un producto deseado, y se entiende,

además, que los niveles de expresión pueden optimizarse para obtener suficiente expresión mediante métodos muy conocidos en la técnica.

El término “huésped”, como se usa en la presente descripción, se refiere a un animal, tal como un mamífero (*p. ej.*, un humano).

5 El término “célula huésped”, como se usa en la presente descripción, se refiere a una célula de un sujeto particular que puede transfectarse con una molécula de ácido nucleico y la progenie o progenie potencial de una célula. La progenie de una célula así puede no ser idéntica a la célula original transfectada con la molécula de ácido nucleico, por ejemplo, debido a mutaciones o influencias ambientales que
10 pueden ocurrir en generaciones posteriores o la integración de la molécula de ácido nucleico en el genoma de la célula huésped.

El término “transfectado” o “transformado” o “transducido”, como se usa en la presente descripción, se refiere a un proceso por el cual se transfiere o introduce ácido nucleico exógeno en la célula huésped. Una célula “transfectada” o “transformada” o
15 “transducida” es aquella que ha sido transfectada, transformada o transducida con ácido nucleico exógeno. La célula incluye la célula sujeto primaria y su progenie.

El término “farmacéuticamente aceptable”, como se usa en la presente descripción, significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal, o enumerado en la Farmacopea de los EE. UU., Farmacopea Europea, u otra
20 farmacopea generalmente reconocida, para usarse en animales y/o en seres humanos.

Por “excipiente” se entiende un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga, diluyente, solvente o material encapsulante líquidos o sólidos. Los excipientes incluyen, por ejemplo, materiales

encapsulantes o aditivos tales como aceleradores de absorción, antioxidantes, aglutinantes, reguladores, portadores, agentes de revestimiento, agentes colorantes, diluyentes, agentes de desintegración, emulsionantes, extensores, cargas, agentes
 5 saborizantes, humectantes, lubricantes, perfumes, conservantes, propelentes, agentes de liberación, agentes esterilizantes, edulcorantes, agentes de solubilización, agentes humectantes y mezclas de estos. El término “excipiente” también puede referirse a un diluyente, adyuvante (*p. ej.*, el adyuvante de Freund (completo o incompleto) o vehículo.

En algunas modalidades, los excipientes son excipientes farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de excipientes farmacéuticamente
 10 aceptables incluyen reguladores, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes; polipéptido de peso molecular bajo (*p. ej.*, menos de aproximadamente 10 residuos de aminoácidos); proteínas; polímeros hidrofílicos; aminoácidos; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos; agentes quelantes; alcoholes de azúcar; contraiones formadores de sales; y/o surfactantes no iónicos. Otros ejemplos
 15 de excipientes farmacéuticamente aceptables se describen en Remington y Gennaro, Remington's Pharmaceutical Sciences (décimo octava ed. 1990).

En una modalidad, cada componente es “farmacéuticamente aceptable” en el sentido de que es compatible con los otros ingredientes de una formulación farmacéutica, y es adecuado para usar en contacto con el tejido u órgano de humanos y animales sin
 20 excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad u otros problemas o complicaciones, acordes con una relación beneficio/riesgo razonable. Ver, *p. ej.*, Lippincott Williams & Wilkins: Filadelfia, PA, 2005; Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6.^a ed.; Ausubel et al., editores. The Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical

Association: 2009; Handbook of Pharmaceutical Additives, 3.^a ed.; Ash y Ash Eds.; Gower Publishing Company: 2007; Pharmaceutical Preformulation and Formulation, 2.^a ed.; A Gibson Ed.; CRC Press LLC: Boca Raton, FL, 2009. En algunas modalidades, los excipientes farmacéuticamente aceptables son no tóxicos para la célula o mamífero que se expone a estos en las dosis y concentraciones usadas. En algunas modalidades, un excipiente farmacéuticamente aceptable es una solución acuosa regulada en pH.

Los vehículos farmacéuticos adecuados para ser usadas en las composiciones son líquidos estériles, tales como el agua y aceites, se incluyen aquellos de petróleo, o de origen animal, vegetal o sintético. El agua es un excipiente ilustrativo cuando una composición (*p. ej.*, una composición farmacéutica) se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y la dextrosa acuosa y soluciones de glicerol también pueden usarse como excipientes líquidos, particularmente para soluciones inyectables. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes reguladores de pH. Las composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación prolongada y lo similar.

Las composiciones, que incluyen composiciones farmacéuticas, pueden contener una molécula de unión (*p. ej.*, un anticuerpo como se describe en la presente descripción), por ejemplo, en forma aislada o purificada, junto con una cantidad adecuada de excipientes.

El término “cantidad efectiva” o “cantidad terapéuticamente efectiva”, como se usa en la presente descripción, se refiere a la cantidad de un anticuerpo o una molécula terapéutica que comprende un agente y el anticuerpo o composición

farmacéutica proporcionada en la presente descripción que es suficiente para producir el resultado deseado.

Los términos “sujeto” y “paciente” pueden usarse indistintamente. Como se usa en la presente descripción, en ciertas modalidades, un sujeto es un mamífero, tal como un no primate o un primate (*p. ej.*, ser humano). En modalidades específicas, el
5 sujeto es un humano. En una modalidad, el sujeto es un mamífero, *p. ej.*, un ser humano, a quien se le ha diagnosticado una enfermedad o trastorno. En otra modalidad, el sujeto es un mamífero, *p. ej.*, un ser humano, con riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno.

“Administrar” o “administración” se refiere al acto de inyectar o, de
10 cualquier otra manera, suministrar físicamente una sustancia, en la medida en que existe fuera del cuerpo, a un paciente, tal como mediante el suministro mucoso, intradérmico, intravenoso, intramuscular y/o cualquier otro método de suministro físico descrito en la presente descripción o conocido en la técnica.

Como se usa en la presente descripción, los términos “tratar”, “tratamiento”,
15 “que trata” se refieren a la reducción o mejoría de la progresión, gravedad y/o duración de una enfermedad o condición que resulta de la administración de una o más terapias. El tratamiento puede determinarse al evaluar si ha habido una disminución, alivio y/o mitigación de uno o más síntomas asociados con el trastorno subyacente de tal manera que se observa una mejoría en el paciente, a pesar de que el paciente aún puede estar
20 afectado por el trastorno subyacente. El término “tratar” incluye tanto la gestión como el mejoramiento de la enfermedad. Los términos “manejar” “gestionar” y “gestión” se refieren a los efectos beneficiosos que un sujeto obtiene de una terapia que no necesariamente resulta en una cura de la enfermedad.

Los términos “prevenir”, “que previene” y “prevención” se refieren a reducir la probabilidad de aparición (o reaparición) de una enfermedad, trastorno, condición o síntoma(s) asociado(s) (*p. ej.*, diabetes o un cáncer).

Los términos “interceptar”, “interceptación” e “intercepción” se refieren a la
5 administración de una terapia temprana en un proceso de enfermedad (*p. ej.*, enfermedad presintomática y/o premaligna) para prevenir, inhibir o retrasar la progresión de la enfermedad (*p. ej.*, para prevenir, inhibir o retrasar la progresión al cáncer en etapa tardía, tal como cáncer maligno).

Como se usa en la presente descripción, “retrasar” el desarrollo de medios de
10 cáncer para diferir, dificultar, ralentizar, retardar, estabilizar y/o posponer el desarrollo de la enfermedad. Este retraso puede ser de períodos de tiempo variables, dependiendo de los antecedentes de la enfermedad y/o individuo que se trata. Como es evidente para un experto en la técnica, un retraso suficiente o significativo puede, en efecto, abarcar la prevención, ya que el individuo no desarrolla la enfermedad. Un método que “retrasa” el
15 desarrollo del cáncer es un método que reduce la probabilidad de desarrollo de la enfermedad en un período de tiempo dado y/o reduce la extensión de la enfermedad en un período de tiempo dado, en comparación con no usar el método. Tales comparaciones se basan típicamente en estudios clínicos, usando un número estadísticamente significativo de individuos. El desarrollo del cáncer se puede detectar usando métodos estándar,
20 incluyendo, pero sin limitarse a, tomografía axial computarizada (CAT Scan, por sus siglas en inglés), resonancia magnética (IRM), ultrasonido abdominal, pruebas de coagulación, arteriografía o biopsia. El desarrollo también puede referirse a la progresión del cáncer que puede ser inicialmente indetectable e incluye la ocurrencia, la recurrencia y el inicio.

La “enfermedad o trastorno asociado a IL-1 β ”, como se usa en la presente descripción, se refiere a una enfermedad o trastorno que comprende una célula o un tejido en el que la IL-1 β se expresa o sobreexpresa. En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno asociado a IL-1 β comprende una célula en la que la IL-1 β se expresa anormalmente. En otras modalidades, la enfermedad o trastorno asociado a IL-1 β comprende una célula en o sobre la que la IL-1 β es deficiente en al menos una de sus actividades.

El término “aproximadamente” significa dentro de 20 %, dentro de 15 %, dentro de 10 %, dentro de 9 %, dentro de 8 %, dentro de 7 %, dentro de 6 %, dentro de 5 %, dentro de 4 %, dentro de 3 %, dentro de 2 %, dentro de 1 %, o menos de un valor o rango dado.

Como se usa en la presente descripción y reivindicaciones, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen las formas plurales a menos que el contexto lo indique claramente de cualquier otra manera.

Se entiende que donde se describen modalidades en la presente descripción con el término “que comprende”, también se proporcionan de cualquier otra manera modalidades análogas descritas en términos de “que consiste en” y/o “que consiste esencialmente en”. También se entiende que donde se describen modalidades en la presente descripción con el uso de la frase “que consiste esencialmente en”, también se proporcionan de cualquier otra manera modalidades análogas descritas en términos de “que consiste en”.

El término “entre”, como se usa en una frase tal como “entre A y B” o “entre A-B”, se refiere a un rango que incluye tanto A como B.

El término “y/o”, como se usa en una frase tal como “A y/o B” en la presente descripción, pretende incluir ambos A y B; A o B; A (solo); y B (solo). De la misma manera, el término “y/o”, como se usa en una frase tal como “A, B y/o C”, pretende abarcar cada una de las siguientes modalidades: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

5.2. Moléculas de unión a IL-1 β

5.2.1. Anticuerpos que se unen a IL-1 β

En un aspecto, se proporcionan en la presente descripción anticuerpos capaces de unirse a IL-1 β . La IL-1 β es una citocina pleiotrópica con numerosas funciones tanto en estados fisiológicos como patológicos. En el cáncer, la IL-1 β facilita un microambiente de soporte tumoral a través de una variedad de mecanismos. Además, la vía IL-1 promueve la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés), dos factores proangiogénicos clave que conducen a la neo formación de capilares, un sello distintivo de la progresión tumoral y esencial para la invasividad tumoral y la metástasis. La IL-1 β también promueve la transición epitelio-mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés) in vitro, que es una etapa crítica en la fase temprana de la cascada metastásica. La IL-1 β puede captar y reprogramar múltiples tipos celulares; por ejemplo, la IL-1 β ha demostrado promover la infiltración de macrófagos y neutrófilos, movilizar poblaciones mieloides inmunosupresoras (p. ej., MDSC), mejorar la infiltración de neutrófilos y amortiguar la infiltración y activación de células T. Se conocen secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de IL-1 β (ver GCID: GC02M112829, HGNC: 5992, NCBI Entrez Gene: 3553, Ensembl: ENSG00000125538,

OMIM®: 147720 y UniProtKB/Swiss-Prot: P01584). En algunas modalidades, los anticuerpos proporcionados en la presente descripción se unen a IL-1 β humana. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-IL-1 β proporcionado en la presente descripción modula una o más actividades de IL-1 β . En algunas modalidades, el anticuerpo anti-IL-1 β proporcionado en la presente descripción es un anticuerpo antagonista.

En una modalidad, los anticuerpos de acuerdo con la descripción son antagonistas de IL-1 β . En otra modalidad, el anticuerpo o fragmento funcional que comprende una porción de unión al antígeno se une a la proteína diana IL-1 β y disminuye la unión de IL-1 β al receptor de interleucina tipo 1 (IL-1RI) a un nivel basal.

En un aspecto de esta modalidad, el anticuerpo o fragmento funcional reduce la cantidad de IL-1 β que se une a IL-1RI. En un aspecto adicional de esta modalidad, el anticuerpo o fragmento funcional previene completamente la IL-1 β de la unión a IL-1RI. En una modalidad adicional, el anticuerpo o fragmento funcional inhibe la activación de la señalización de IL-1. Se entenderá que un anticuerpo que inhibe una o más de estas propiedades funcionales de IL-1 β (p. ej., actividades bioquímicas, inmunoquímicas, celulares, fisiológicas u otras actividades biológicas, o lo similar) determinadas de acuerdo a metodologías conocidas en la técnica y descritas en la presente descripción, se relacionan con una disminución estadísticamente significativa en la actividad particular en relación con la observada en ausencia del anticuerpo (p. ej., o cuando está presente un anticuerpo de control de especificidad irrelevante). En algunas modalidades, un anticuerpo que inhibe la actividad de IL-1 β provoca una disminución estadísticamente significativa en al menos un 10 % del parámetro medido, en al menos

50 %, 80 % o 90 %, y en ciertas modalidades un anticuerpo de la descripción puede inhibir más del 95 %, 98 % o 99 % de actividad funcional de IL-1 β .

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-IL-1 β proporcionado en la presente descripción se une a IL-1 β (p. ej., IL-1 β humana) con una constante de disociación (KD) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 200 \text{ nM}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 50 \text{ nM}$, $\leq 20 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,05 \text{ nM}$, $\leq 0,02 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$, $\leq 0,001 \text{ nM}$ (p. ej. 20 pM, 22 pM, 64 pM, 70 pM, 180 pM, o 1,7 nM, p. ej. 10^{-8} M o menos, p. ej. de 10^{-8} M a 10^{-13} M , p. ej., de 10^{-9} M a 10^{-13} M , p. ej. de 10^{-10} M a 10^{-13} M). En la técnica se conocen una variedad de métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales se puede usar para los fines de la presente descripción, incluyendo mediante RIA, por ejemplo, realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno (Chen et al., 1999, J. Mol Biol 293: 865-81); mediante ensayos de interferometría de biocapa (BLI, por sus siglas en inglés) o de resonancia de plasmones de superficie (SPR, por sus siglas en inglés) por Octet®, usando, por ejemplo, un sistema Octet®Red96, o por Biacore®, usando, por ejemplo, un Biacore®TM-2000 o un Biacore®TM-3000. Una “tasa activa” o “tasa de asociación” o “kactiva” también se puede determinar con las mismas técnicas de interferometría de biocapa (BLI, por sus siglas en inglés) o de resonancia de plasmones de superficie (SPR, por sus siglas en inglés) descritas anteriormente usando, por ejemplo, el sistema Octet®Red96, el Biacore®TM-2000 o el Biacore®TM-3000.

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-IL-1 β proporcionados en la presente descripción son los descritos en la Sección 7 a continuación. Por lo tanto, en algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción comprende una o más secuencias de CDR de cualquiera de las de la sec. con núm. de ident.: 13-102.

Las secuencias de CDR pueden determinarse de acuerdo con sistemas de numeración conocidos. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de IMGT. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Kabat. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de AbM. En otras 5 modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Chothia. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Contact. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-IL-1 β es humanizado. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-IL-1 β comprende un marco humano aceptor, p. ej., un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano.

10 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-IL-1 β proporcionado en la presente descripción comprende HCDR1, HCDR2, y HCDR3 como se establece en la sec. con núm. de ident.: 7. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-IL-1 β proporcionado en la presente descripción comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 como se establece en la sec. con núm. de ident.: 9. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-IL-1 β proporcionado en 15 la presente descripción comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 como se establece en la sec. con núm. de ident.: 11. Las secuencias de CDR pueden determinarse de acuerdo con sistemas de numeración muy conocidos o una combinación de estos. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de IMGT. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Kabat. En algunas 20 modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de AbM. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Chothia. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Contact.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-IL-1 β proporcionado en la presente descripción comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 como se establece en la sec. con núm. de ident.: 8. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-IL-1 β proporcionado en la presente descripción comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 como se establece en la sec. con núm. de ident.: 10. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-IL-1 β proporcionado en la presente descripción comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 como se establece en la sec. con núm. de ident.: 12. Las secuencias de CDR pueden determinarse de acuerdo con sistemas de numeración muy conocidos o una combinación de estos. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de IMGT. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Kabat. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de AbM. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Chothia. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Contact.

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente descripción comprende una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 como se establece en la sec. con núm. de ident.: 7, y una LCDR1, una LCDR2 y una LCDR3 como se establece en la sec. con núm. de ident.: 8. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente descripción comprende una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 como se establece en la sec. con núm. de ident.: 9, y una LCDR1, una LCDR2 y una LCDR3 como se establece en la sec. con núm. de ident.: 10. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente descripción comprende una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 como se establece en la sec. con

núm. de ident.: 11, y una LCDR1, una LCDR2 y una LCDR3 como se establece en la sec. con núm. de ident.: 12. Las secuencias de CDR pueden determinarse de acuerdo con sistemas de numeración muy conocidos o una combinación de estos. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de IMGT. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Kabat. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de AbM. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Chothia. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Contact.

En otras modalidades, en la presente descripción se proporciona un anticuerpo que se une a IL-1 β que comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 13, 19, 25, 31, 37, 43, 49, 55, 61, 67, 73, 79, 85, 91 y 97; (ii) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 14, 20, 26, 32, 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74, 80, 86, 92 y 98, (ii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con las sec. con núm. de ident.: 15, 21, 27, 33, 39, 45, 51, 57, 63, 69, 75, 81, 87, 93 y 99; (iv) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de

secuencia con cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 16, 22, 28, 34, 40, 46, 52, 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94 y 100; (v) una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 17, 23, 29, 35, 41, 47, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95 y 101; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96 y 102. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-IL-1 β es humanizado. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-IL-1 β comprende un marco humano aceptor, *p. ej.*, un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano.

En algunas modalidades específicas, en el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente descripción, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 13, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 14, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 15, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 16, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 17, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 18. En algunas modalidades específicas, en el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente descripción, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 31, la HCDR2 comprende la secuencia de

aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 32, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 33, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 34, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 35, y la LCDR3 comprende la secuencia

5 de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 36. En algunas modalidades específicas, en el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente descripción, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 49, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 50, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec.

10 con núm. de ident.: 51, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 52, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 53, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 54. En algunas modalidades específicas, en el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente descripción, la HCDR1

15 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 67, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 68, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 69, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 70, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 71, y la

20 LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 72. En algunas modalidades específicas, en el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente descripción, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 85, la HCDR2 comprende la secuencia de

aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 86, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 87, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 88, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 89, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 90.

En algunas modalidades específicas, en el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente descripción, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 19, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 21, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 22, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 23 y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 24. En algunas modalidades específicas, en el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente descripción, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 37, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 38, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 39, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 40, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 41 y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 42. En algunas modalidades específicas, en el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente descripción, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 55, la HCDR2 comprende la secuencia de

aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 56, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 57, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 58, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 59 y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 60. En algunas modalidades específicas, en el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente descripción, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 73, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 74, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 75, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 76, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 77 y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 78. En algunas modalidades específicas, en el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente descripción, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 91, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 92, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 93, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 94, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 95 y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 96.

En algunas modalidades específicas, en el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente descripción, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 25, la HCDR2 comprende la

secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 26, la HCDR3 comprende la
secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 27, la LCDR1 comprende la
secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 28, la LCDR2 comprende la
secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 29, y la LCDR3 comprende
5 la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 30. En algunas
modalidades específicas, en el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno
proporcionado en la presente descripción, la HCDR1 comprende la secuencia de
aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 43, la HCDR2 comprende la secuencia de
aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 44, la HCDR3 comprende la secuencia de
10 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 45, la LCDR1 comprende la secuencia de
aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 46, la LCDR2 comprende la secuencia de
aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 47, y la LCDR3 comprende la secuencia
de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 48. En algunas modalidades
específicas, en el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la
15 presente descripción, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec.
con núm. de ident.: 61, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec.
con núm. de ident.: 62, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec.
con núm. de ident.: 63, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec.
con núm. de ident.: 64, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec.
20 con núm. de ident.: 65, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la
sec. con núm. de ident.: 66. En algunas modalidades específicas, en el anticuerpo o
fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente descripción, la HCDR1
comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 79, la HCDR2

comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 80, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 81, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 82, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 83, y la

5 LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 84. En algunas modalidades específicas, en el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente descripción, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 97, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 98, la HCDR3 comprende la secuencia de

10 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 99, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 100, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 101, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 102.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además una o más regiones

15 marco de las sec. con núms. de ident.: 13-102. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción es un anticuerpo humanizado. Las regiones marco descritas en la presente descripción se determinan basadas en los límites del sistema de numeración de CDR. En otras palabras, si las CDR se determinan mediante, p. ej., Kabat, IMGT o Chothia, después las regiones marco son los residuos de aminoácidos

20 que rodean las CDR en la región variable en el formato, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Por ejemplo, FR1 se define como los residuos de aminoácidos N-terminales a los residuos de aminoácidos de CDR1 como lo define, p. ej., el sistema de numeración de Kabat, el sistema de numeración de

IMGT o el sistema de numeración de Chothia; FR2 se define como los residuos de aminoácidos entre los residuos de aminoácido de CDR1 y CDR2 como lo define, p. ej., el sistema de numeración de Kabat; el sistema de numeración de IMGT o el sistema de numeración de Chothia; FR3 se define como los residuos de aminoácidos entre los
5 residuos de aminoácidos de CDR2 y CDR3 como lo define, p. ej., el sistema de numeración de Kabat; el sistema de numeración de IMGT o el sistema de numeración de Chothia; y FR4 se define como los residuos de aminoácidos de C-terminal a los residuos de aminoácidos de CDR3 como lo define, p. ej., el sistema de numeración de Kabat, el sistema de numeración de IMGT o el sistema de numeración de Chothia.

10 En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente descripción comprende una VH que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 7, y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 8. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente descripción
15 comprende una VH que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 9, y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 10. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente descripción comprende una VH que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 11, y una VL que comprende
20 una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 12.

En ciertas modalidades, un anticuerpo descrito en la presente descripción o un fragmento de unión al antígeno de este, comprende secuencias de aminoácidos con cierto

porcentaje de identidad en relación con cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente descripción, por ejemplo, los descritos en la Sección 6 a continuación.

La determinación de la identidad porcentual entre dos secuencias (p. ej., secuencias de aminoácidos o secuencias de ácido nucleico) puede lograrse mediante un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitante de un algoritmo matemático usado para la
5 comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264 2268 (1990), modificado como en Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873 5877 (1993). Tal algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215:403 (1990). Las búsquedas de nucleótidos por
10 BLAST pueden realizarse con el conjunto de parámetros del programa de nucleótidos NBLAST, p. ej., para puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente descripción. Las búsquedas de proteínas por BLAST pueden realizarse con el conjunto de parámetros del programa XBLAST, p. ej., para puntuación 50, longitud de palabra = 3,
15 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína descrita en la presente descripción. Para obtener alineamientos interrumpidos para fines de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389 3402 (1997). Alternativamente, el programa PSI BLAST puede usarse para realizar una búsqueda iterativa que detecta las distintas relaciones entre moléculas
20 (Id.). Cuando se usan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI BLAST, pueden usarse los parámetros predeterminados de los respectivos programas (p. ej., de XBLAST y NBLAST) (ver, p. ej., National Center for Biotechnology Information (NCBI) en la red mundial, ncbi.nlm.nih.gov). Otro ejemplo no limitante de un algoritmo matemático usado

para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS 4:11-17 (1998). Tal algoritmo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineamiento de secuencias GCG. Cuando se usa el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, pueden usarse una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización por longitud de espacio de 12, y una penalización por espacio de 4. La identidad porcentual entre dos secuencias puede determinarse mediante técnicas similares a las descritas anteriormente, con o sin permitir espacios. Para calcular la identidad porcentual, típicamente solo se cuentan las coincidencias exactas.

En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción contiene sustituciones (p. ej., sustituciones conservativas), inserciones o deleciones en relación con la secuencia de referencia, pero el anticuerpo anti-IL-1 β que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a IL-1 β . En algunas modalidades, se han sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en una secuencia de aminoácidos de referencia. En algunas modalidades, las sustituciones, inserciones o deleciones ocurren en regiones fuera de las CDR (es decir, en las FR). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-IL-1 β proporcionado en la presente descripción incluye modificaciones postraduccionales de una secuencia de referencia.

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente descripción comprende un dominio VH que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 7, y un dominio VL que tiene al menos

75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 8. En algunas modalidades, el anticuerpo o

5 fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente descripción comprende un dominio VH que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 9, y un

10 dominio VL que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 10. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en

15 la presente descripción comprende un dominio VH que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 11, y un dominio VL que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos

20 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 12. En todas las modalidades descritas anteriormente, los anticuerpos se unen a IL-1 β .

En algunas modalidades, los epítomos funcionales pueden mapearse, *p. ej.*, mediante barrido de alanina combinatorio, para identificar aminoácidos en la proteína IL-1 β que son necesarios para la interacción con anticuerpos anti- IL-1 β proporcionados en la presente descripción. En algunas modalidades, la estructura cristalina y conformacional del anticuerpo anti- IL-1 β unido al IL-1 β puede usarse para identificar los epítomos. En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo que se une específicamente al mismo epítomo que cualquiera de los anticuerpos anti- IL-1 β proporcionados en la presente descripción. Por ejemplo, en algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente descripción se une al mismo epítomo que un anticuerpo anti-IL-1 β que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 7, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 8. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente descripción se une al mismo epítomo que un anticuerpo anti-IL-1 β que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 9, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 10. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente descripción se une al mismo epítomo que un anticuerpo anti-IL-1 β que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 11, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 12.

En algunas modalidades, en la presente descripción se proporciona un anticuerpo anti-IL-1 β , o un fragmento de unión al antígeno de este, que se une específicamente a IL-1 β competitivamente con uno cualquiera de los anticuerpos anti-IL-

1 β descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en esta descripción se une específicamente a IL-1 β competitivamente con un anticuerpo anti-IL-1 β que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 7, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 8. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en esta descripción se une específicamente a IL-1 β competitivamente con un anticuerpo anti-IL-1 β que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 9, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 10. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en esta descripción se une específicamente a IL-1 β competitivamente con un anticuerpo anti-IL-1 β que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 11, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 12.

En algunas modalidades, se proporciona en la presente descripción una proteína de unión a IL-1 β que comprende uno cualquiera de los anticuerpos anti-IL-1 β descritos anteriormente. En algunas modalidades, la proteína de unión a IL-1 β es un anticuerpo monoclonal, que incluye un anticuerpo de ratón, quimérico, humanizado o humano. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-IL-1 β es un fragmento de anticuerpo, *p. ej.*, un scFv. En algunas modalidades, la proteína de unión a IL-1 β es una proteína de fusión que comprende el anticuerpo anti-IL-1 β proporcionado en la presente descripción. En otras modalidades, la proteína de unión a IL-1 β es un anticuerpo multiespecífico que comprende el anticuerpo anti-IL-1 β proporcionado en

la presente descripción. Otras moléculas de unión a IL-1 β ilustrativas se describen con mayor detalle en las siguientes secciones.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti- IL-1 β o proteína de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores puede incorporar cualquiera de las características, individualmente o en combinación, como se describe en las secciones 5.2.2 a 5.2.7 más abajo.

5.2.2. Fragmentos del anticuerpo

Como se usa en la presente descripción, el término “anticuerpo” también incluye varios fragmentos de anticuerpos de estos. Los anticuerpos proporcionados en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina. Las moléculas de inmunoglobulina proporcionadas en la presente descripción pueden ser de cualquier clase (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o de cualquier subclase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) de la molécula de inmunoglobulina. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo IgG. En algunas modalidades, el anticuerpo IgG es un anticuerpo IgG1. En algunas modalidades, el anticuerpo IgG es un anticuerpo IgG2, IgG3, o IgG4.

Las variantes y los derivados de anticuerpos incluyen fragmentos funcionales de anticuerpo que retienen la capacidad de unirse a un antígeno. Los fragmentos funcionales ilustrativos incluyen fragmentos Fab (p. ej., un fragmento de anticuerpo que contiene el dominio de unión al antígeno y comprende una cadena ligera y parte de una cadena pesada unidas por un enlace disulfuro); el Fab' (p. ej., un fragmento de anticuerpo que contiene un dominio único de unión al antígeno que comprende un Fab y una porción adicional de la cadena pesada a través de la región bisagra); el F(ab')₂ (p. ej., dos

moléculas de Fab' unidas por enlaces disulfuro intercatenarios en las regiones bisagra de las cadenas pesadas; las moléculas de Fab' pueden dirigirse hacia el mismo o diferentes epítomos); un Fab biespecífico (p. ej., una molécula de Fab que tiene dos dominios de unión al antígeno, cada uno de los cuales puede dirigirse a un epítomo diferente); una

5 cadena única que comprende una región variable, también conocida como scFv (p. ej., la región determinante de unión al antígeno, variable, de una única cadena ligera y pesada de un anticuerpo unidas entre sí por una cadena de, p. ej., 10-25 aminoácidos); un Fv unido por disulfuro o dsFv (p. ej., la región determinante de unión al antígeno, variable, de una única cadena ligera y pesada de un anticuerpo unidas entre sí por un enlace

10 disulfuro); una VH camélida (p. ej., la región determinante de unión al antígeno, variable, de una cadena pesada única de un anticuerpo en el que algunos aminoácidos en la interfaz de VH son los que se encuentran en la cadena pesada de anticuerpos de camello de origen natural); un scFv biespecífico (p. ej., una molécula de scFv o dsFv que tiene dos dominios de unión al antígeno, cada uno de los cuales puede dirigirse a un epítomo

15 diferente); un diacuerpo (p. ej., un scFv dimerizado formado cuando el dominio de VH de un primer scFv se ensambla con el dominio de VL de un segundo scFv y el dominio de VL del primer scFv se ensambla con el dominio de VH del segundo scFv; las dos regiones de unión al antígeno del diacuerpo pueden dirigirse hacia el mismo o diferentes epítomos); un triacuerpo (p. ej., un scFv trimerizado, formado de manera similar a un diacuerpo, pero en

20 el que se crean tres dominios de unión al antígeno en un complejo único; los tres dominios de unión al antígeno pueden dirigirse hacia el mismo o diferentes epítomos); y un tetracuerpo (p. ej., un scFv tetramerizado, formado de manera similar a un diacuerpo, pero

en el que se crean cuatro dominios de unión al antígeno en un único complejo; los cuatro dominios de unión al antígeno pueden dirigirse hacia el mismo o diferentes epítomos).

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (ver, p. ej., Morimoto et al., 1992, J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-17; y Brennan et al., 1985, Science 229: 81-83). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente mediante células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y scFv pueden todos expresarse y secretarse a partir de células de E. coli o de levadura, lo que permite, por lo tanto, la producción fácil de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las genotecas de fagos de anticuerpos descritas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente a partir de E. coli y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., 1992, Bio/Technology 10: 163-67). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente del cultivo de células huésped recombinantes. El fragmento Fab y F(ab')₂ con vida media in vivo aumentada que comprende residuos de epítomos de unión al receptor de salvamento se describen en, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. núm. 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo resultarán evidentes para el experto en la técnica. En ciertas modalidades, un anticuerpo es un fragmento Fv de cadena única (scFv) (ver, p. ej., WO 93/16185; las patentes de los EE. UU. núms. 5.571.894 y 5.587.458). El Fv y scFv tienen sitios de combinación intactos que carecen de regiones constantes; por lo tanto, pueden ser adecuados

para una unión inespecífica reducida durante el uso in vivo. Las proteínas de fusión de scFv pueden construirse para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo amino o carboxi de un scFv (ver, p. ej., Borrebaeck ed., supra). El fragmento de anticuerpo también puede ser un “anticuerpo lineal”, por ejemplo, como se describe en las referencias citadas anteriormente. Tales anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos, tales como biespecíficos.

5.2.3. Anticuerpos humanizados

Los anticuerpos descritos en la presente descripción incluyen anticuerpos humanizados. Los anticuerpos humanizados, tales como los anticuerpos humanizados descritos en la presente descripción, pueden producirse usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, el injerto de CDR (patente europea núm. EP 239.400; publicación internacional núm. WO 91/09967; y las patentes de los EE. UU. núms. 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), enchapado o acondicionamiento (patentes europeas núms. EP 592.106 y EP 519.596; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5): 489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6): 805-814 (1994); y Roguska et al., PNAS 91:969-973 (1994)), la combinación de cadenas (patente de los EE. UU. núm. 5.565.332) y las técnicas descritas en, p. ej., la patente de los EE. UU. núm. 6.407.213; patente de los EE. UU. núm. 5.766.886, WO 9317105; Tan et al., J. Immunol. 169:1119-1125 (2002), Caldas et al., Protein Eng. 13(5):353-60 (2000), Morea et al., Methods 20(3):267-279 (2000), Baca et al., J. Biol. Chem. 272(16):10678-84 (1997), Roguska et al., Protein Eng. 9(10):895-904 (1996), Couto et al., Cancer Res. 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995), Couto et al., Cancer Res. 55(8):1717-22 (1995), Sandhu JS, Gene 150(2):409-10 (1994), and Pedersen et al., J. Mol. Biol. 235(3):959-73 (1994). Ver también la publicación

de patente de los EE. UU. US 2005/0042664 A1 (24 de febrero de 2005), cada una de las cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia.

En algunas modalidades, los anticuerpos proporcionados en la presente descripción pueden ser anticuerpos humanizados que se unen a IL-1 β , incluyendo IL-1 β humana. Por ejemplo, los anticuerpos humanizados de la presente descripción pueden comprender una o más CDR expuestas en las sec. con núms. de ident.: 13-102. Diversos métodos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humano. Estos residuos de aminoácido no humanos se denominan, frecuentemente, como residuos de “importación”, que se toman, típicamente, de un dominio variable de “importación”. La humanización puede realizarse, por ejemplo, siguiendo el método de Jones et al., Nature 321: 522-25 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-27 (1988); y Verhoeven et al., Science 239: 1534-36 (1988)), al sustituir secuencias de región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En una modalidad específica, la humanización del anticuerpo proporcionado en la presente descripción se realiza como se describe en la Sección 6 a continuación.

En algunos casos, los anticuerpos humanizados se construyen mediante injerto de CDR, en el que las secuencias de aminoácidos de las CDR del anticuerpo no humano parental se injertan en un marco de anticuerpo humano. Por ejemplo, Padlan et al. determinaron que solo aproximadamente un tercio de los residuos en las CDR realmente entran en contacto con el antígeno, y denominaron a estos los “residuos determinantes de especificidad” o SDR (por sus siglas en inglés) (Padlan et al., FASEB J. 9: 133-39 (1995)).

En la técnica de injerto de SDR, solo los residuos SDR se injertan en el marco del anticuerpo humano (ver, p. ej., Kashmiri et al., *Methods* 36: 25-34 (2005)).

La elección de los dominios variables humanos que se usarán para preparar los anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad. Por ejemplo, de acuerdo con el método denominado “mejor ajuste”, la secuencia del dominio variable de un anticuerpo no humano se analiza frente a la genoteca completa de secuencias de dominio variable humano conocidas. La secuencia humana que está más cercana a la del anticuerpo no humano puede seleccionarse como el marco humano para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.* 151:2296-308 (1993); y Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-17 (1987)). Otro método usa un marco particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285-89 (1992); y Presta et al., *J. Immunol.* 151:2623-32 (1993)). En algunos casos, el marco se deriva de las secuencias de consenso de las subclases humanas más abundantes, el subgrupo I (V_{L6I}) de V_{L6} y el subgrupo III (V_{HIII}) de V_H. En otro método, los genes de la línea germinal humana se usan como fuente de las regiones marco.

En un paradigma alternativo basado en comparación de las CDR, se llama superhumanización, la homología de FR es irrelevante. El método consiste en comparar la secuencia no humana con el repertorio funcional de genes de la línea germinal humana. Después se seleccionan aquellos genes que codifican las mismas estructuras canónicas o estrechamente relacionadas a las secuencias murinas. A continuación, dentro de los genes que comparten las estructuras canónicas con el

anticuerpo no humano, aquellos con homología más alta dentro de las CDR se eligen como donantes de FR. Finalmente, las CDR no humanas se injertan en estos FR (ver, p. ej., Tan et al., J. Immunol. 169:1119-25 (2002)).

Además, es generalmente deseable que los anticuerpos se humanicen con la
5 retención de su afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar este objetivo, de acuerdo con un método, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina
10 se encuentran disponibles comúnmente y resultan familiares para los expertos en la técnica. Los programas de computación que ilustran y muestran las estructuras de conformación tridimensional probables de las secuencias seleccionadas de la inmunoglobulina candidato se encuentran disponibles. Estos incluyen, por ejemplo, WAM (Whitelegg and Rees, Protein Eng. 13: 819-24 (2002)), Modeller (Sali and Blundell, J.
15 Mol. Biol. 234: 779-815) y Swiss PDB Viewer (Guex and Peitsch, Electrophoresis 18: 2714-23 (1997)). La inspección de estas exhibiciones permite el análisis del probable rol de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, p. ej., el análisis de residuos que influencia la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos FR pueden seleccionarse y
20 combinarse a partir de las secuencias de consenso e importación de manera que se alcancen las características deseadas del anticuerpo, tal como, afinidad aumentada por el(los) antígeno(s) diana(s). Generalmente, los residuos de la región hipervariable están directamente y más sustancialmente involucrados en influenciar la unión al antígeno.

Otro método para la humanización de anticuerpos está basado en una métrica de humanidad del anticuerpo denominado Contenido de cadena humana (HSC, por sus siglas en inglés). Este método compara la secuencia de ratón con el repertorio de genes de la línea germinal humana, y las diferencias se califican como HSC. La secuencia diana después se humaniza maximizando su HSC en lugar de usar una medida de identidad global para generar múltiples variantes humanizadas diversas (Lazar et al., Mol. Immunol. 44:1986-98 (2007)).

Además de los métodos descritos anteriormente, los métodos empíricos pueden usarse para generar y seleccionar anticuerpos humanizados. Estos métodos incluyen aquellos que se basan en la generación de grandes genotecas de variantes humanizadas y la selección de los mejores clones usando tecnologías de enriquecimiento o técnicas de evaluación de productividad alta. Las variantes de anticuerpos pueden aislarse de genotecas de exhibición de fagos, ribosomas y levaduras, así como mediante la evaluación de colonias bacterianas (ver, p. ej., Hoogenboom, Nat. Biotechnol. 23:1105-16 (2005); Dufner et al., Trends Biotechnol. 24:523-29 (2006); Feldhaus et al., Nat. Biotechnol. 21:163-70 (2003); y Schlapschky et al., Protein Eng. Des. Sel. 17:847-60 (2004)).

En el enfoque de la genoteca de FR, se introduce una colección de variantes de residuos en posiciones específicas en la FR seguida de la evaluación de la genoteca para seleccionar la FR que mejor respalda la CDR injertada. Los residuos a sustituir pueden incluir algunos o todos los residuos “Vernier” identificados como potencialmente contribuyentes a la estructura de CDR (ver, p. ej., Foote and Winter, J.

Mol. Biol. 224: 487-99 (1992)), o del conjunto más limitado de residuos diana identificados por Baca et al. J. Biol. Chem. 272:10678-84 (1997).

En el barajado de FR, los FR completos se combinan con las CDR no humanas en lugar de crear genotecas combinatorias de variantes de residuos seleccionadas (ver, p. ej., Dall'Acqua et al., Methods 36: 43-60 (2005)). Puede usarse un proceso de barajado de FR de una etapa. Se ha demostrado que tal proceso es eficiente, ya que los anticuerpos resultantes exhibieron propiedades bioquímicas y fisicoquímicas mejoradas que incluyen una expresión mejorada, mayor afinidad y estabilidad térmica (ver, p. ej., Damschroder et al., Mol. Immunol. 44:3049-60 (2007)).

El método “humanización” se basa en la identificación experimental de determinantes de especificidad mínimos esenciales (MSD) y se basa en el reemplazo secuencial de fragmentos no humanos en genotecas de FR humanas y evaluación de unión. Esta metodología típicamente da como resultado la retención de epítomos e identificación de anticuerpos de subclases múltiples con distintas CDR del segmento V humano.

El método de “ingeniería genética humana” implica alterar un anticuerpo no humano o fragmento de anticuerpo al hacer cambios específicos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo para producir un anticuerpo modificado con inmunogenicidad reducida en un ser humano que no obstante retiene las propiedades de unión deseables de los anticuerpos no humanos originales. Generalmente, la técnica implica clasificar los residuos de aminoácidos de un anticuerpo no humano como residuos de “bajo riesgo,” “riesgo moderado,” o “alto riesgo”. La clasificación se realiza usando un cálculo de riesgo/recompensa global que evalúa los beneficios

previstos de hacer una sustitución particular (p. ej., para inmunogenicidad en humanos) frente al riesgo de que la sustitución afecte el plegado del anticuerpo resultante. El residuo de aminoácido humano particular que se sustituirá en una posición determinada (p. ej., un riesgo bajo o moderado) de una secuencia de anticuerpos no humanos se puede seleccionar alineando una secuencia de aminoácidos de las regiones variables del anticuerpo no humano con la región correspondiente de una secuencia de anticuerpo humano específica o de consenso. Los residuos de aminoácidos en posiciones de riesgo bajo o moderado en la secuencia no humana pueden sustituirse por los residuos correspondientes en la secuencia del anticuerpo humano de acuerdo con el alineamiento. Las técnicas para fabricar proteínas de ingeniería humana se describen con mayor detalle en Studnicka et al., Protein Engineering 7: 805-14 (1994); las patentes de los EE. UU. núms. 5.766.886; 5.770.196; 5.821.123; y 5.869.619; y la publicación PCT núm. WO 93/11794.

Un anticuerpo humano compuesto puede generarse mediante, por ejemplo, la tecnología Composite Human Antibody™ (Antitope Ltd., Cambridge, United Kingdom). Para generar anticuerpos humanos compuestos, las secuencias de región variable se diseñan a partir de fragmentos de múltiples secuencias de región variable de anticuerpo humano de una manera que evita los epítomos de células T, lo que minimiza por lo tanto la inmunogenicidad del anticuerpo resultante.

Un anticuerpo desinmunizado es un anticuerpo en el cual se han eliminado los epítomos de células T. Se han descrito métodos para elaborar anticuerpos desinmunizados. Ver, p. ej., Jones et al., Methods Mol Biol. 525: 405-23 (2009), xiv, y De Groot et al., Cell. Immunol. 244:148-153(2006)). Los anticuerpos desinmunizados

comprenden regiones variables agotadas de epítomos de células T y regiones constantes humanas. Brevemente, las regiones variables de un anticuerpo se clonan y los epítomos de células T se identifican, posteriormente, mediante pruebas de péptidos superpuestos derivados de las regiones variables del anticuerpo en un ensayo de proliferación de células T. Los epítomos de células T se identifican por medio de métodos in silicio para identificar la unión peptídica al MHC humano de clase II. Se introducen mutaciones en las regiones variables para anular la unión al MHC clase II humano. Las regiones variables mutadas se usan, después, para generar el anticuerpo desinmunizado.

5.2.4. Variantes de anticuerpos

En algunas modalidades, se contemplan una modificación o modificaciones de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos que se unen a IL-1 β descritos en la presente descripción. Por ejemplo, puede ser deseable optimizar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo, que incluyen pero no limitan a la especificidad, termoestabilidad, nivel de expresión, funciones efectoras, glicosilación, inmunogenicidad reducida o solubilidad. Por lo tanto, además de los anticuerpos que se unen a IL-1 β descrito en la presente descripción, se contempla que pueden prepararse variantes de los anticuerpos que se unen a IL-1 β descritos en la presente descripción. Por ejemplo, las variantes de anticuerpo pueden prepararse mediante la introducción de cambios de nucleótidos apropiados en el ADN codificante y/o mediante la síntesis del anticuerpo o polipéptido deseado. Los expertos en la técnica que aprecian los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesamiento postraduccionales del anticuerpo.

Modificaciones químicas

En algunas modalidades, los anticuerpos proporcionados en la presente descripción se modifican químicamente, por ejemplo, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo. Los derivados del anticuerpo pueden incluir anticuerpos que han sido modificados químicamente, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización con grupos de protección/bloqueo conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, o conjugación con uno o más dominios de inmunoglobulina (*p. ej.*, Fc o una porción de un Fc). Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas pueden llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, que incluyen, pero no se limitan a, escisión química específica, acetilación, formulación, síntesis metabólica de tunicamicina, *etc.* Adicionalmente, el anticuerpo puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

En ciertas modalidades, un anticuerpo proporcionado en la presente descripción se altera para aumentar o disminuir el grado en que el anticuerpo está glicosilado. La adición o delección de sitios de glicosilación a un anticuerpo puede lograrse convenientemente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de tal manera que se crea o elimina uno o más sitios de glicosilación.

Cuando el anticuerpo proporcionado en la presente descripción se fusiona a una región Fc, el carbohidrato unido al mismo puede alterarse. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamíferos comprenden típicamente un oligosacárido biantenarico ramificado que generalmente está unido por un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Ver, *p. ej.*, Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir varios carbohidratos, *p. ej.*, manosa, n-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa

y ácido siálico, así como una fucosa unida a un GlcNAc en el “vástago” de la estructura de oligosacárido biantenarico. En algunas modalidades, las modificaciones del oligosacárido en las moléculas de unión proporcionadas en la presente descripción pueden hacerse para crear variantes con ciertas propiedades mejoradas.

5 En otras modalidades, cuando el anticuerpo proporcionado en la presente descripción se fusiona a una región Fc, las variantes de anticuerpo proporcionadas en la presente descripción pueden tener una estructura de carbohidratos que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a dicha región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en tal anticuerpo puede ser de 1 % a 80 %, de 1 % a 65 %, de 5 % a 65 % o de
10 20 % a 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, en relación con la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn 297 (*p. ej.*, estructuras complejas, híbridas y de alta manosa) medidas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe en WO 2008/077546, por ejemplo. El Asn297 se refiere al residuo de asparagina
15 ubicado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración EU de residuos de la región Fc); sin embargo, el Asn297 también puede ubicarse aproximadamente ± 3 aminoácidos aguas arriba o aguas abajo de la posición 297, es *decir*, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia menores en anticuerpos. Tales variantes de fucosilación pueden haber mejorado la función de
20 ADCC. *Ver, p. ej.*, las publicaciones de patentes de los EE. UU. núms. US 2003/0157108 y US 2004/0093621. Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos “defucosilados” o “deficientes en fucosa” incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US

2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 0336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614

- 5 (2004). Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos defucosilados incluyen células Lec13 CHO deficientes en la fucosilación de proteínas (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 0249:533-545 (1986); la solicitud de patente de los EE. UU. núm. US 2003/0157108; y WO 2004/056312, y líneas celulares inactivadas, tales como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO
- 10 inactivadas (*ver, p. ej.*, Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4): 680-688 (2006); y WO2003/085107).

Las moléculas de unión que comprenden un anticuerpo proporcionado en la presente descripción se proporcionan además con oligosacáridos bisecados, *p. ej.*, en el que un oligosacárido biantenarío unido a la región Fc se bisecciona por GlcNAc.

- 15 Tales variantes pueden tener una fucosilación reducida y/o función de ADCC mejorada. Se describen ejemplos de tales variantes, *p. ej.*, en WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); patente de los EE. UU. núm. 6.602.684 (Umana et al.); y US 2005/0123546 (Umana et al.). También se proporcionan variantes con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Tales variantes pueden
- 20 haber mejorado la función de CDC. Tales variantes se describen, *p. ej.*, en WO 1997/30087; WO 1998/58964; y WO 1999/22764.

En moléculas que comprenden el presente anticuerpo y una región Fc, pueden introducirse una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc,

generando así una variante de región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (*p. ej.*, una región IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 Fc humana) que comprende una modificación de aminoácidos (*p. ej.*, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

5 En algunas modalidades, la presente solicitud contempla variantes que poseen algunas pero no todas las funciones efectoras, que la convierten en un candidato deseable para aplicaciones en las que la vida media de la molécula de unión *in vivo* es importante, pero ciertas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, los ensayos de unión al receptor Fc (FcR) pueden realizarse para garantizar que la molécula de unión carezca de unión a FcγR (por lo tanto, probablemente carezca de actividad de ADCC) pero retenga la capacidad de unión a FcRn. Los ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de los EE. UU. núm. 5.500.362 (*ver*, *p. ej.*, Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5.821.337 (*ver* Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). Alternativamente, se pueden emplear métodos de ensayos no radioactivos (*ver*, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI) Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) y células asesinas naturales (NK, por sus siglas en

inglés). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, *p. ej.*, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). También pueden realizarse ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es capaz de unirse a C1q y por lo tanto carece de actividad CDC. *Ver, p. ej.*, ELISA de unión a C1q y C3c en WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC (*ver, p. ej.*, Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., *Blood* 101: 1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. and M.J. Glennie, *Blood* 103: 2738-2743 (2004)). La unión a FcRn y las determinaciones de eliminación/vida media *in vivo* también pueden realizarse usando métodos conocidos en la técnica (*ver, p. ej.*, Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

Las moléculas de unión con función efectora reducida incluyen aquellas con sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente de los EE. UU. núm. 6.737.056). Tales mutantes Fc incluyen mutantes Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, que incluyen el mutante Fc denominado "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (patente de los EE. UU. núm. 7.332.581).

Se describen ciertas variantes con unión mejorada o disminuida a FcR. (*Ver, p. ej.*, la patente de los EE. UU. núm. 6.737.056; WO 2004/056312, y Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).)

En ciertas modalidades, una variante comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, *p. ej.*, sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración de residuos de la UE). En algunas

modalidades, se hacen alteraciones en la región Fc que resultan en la unión a C1q alterada (*es decir*, ya sea mejorada o disminuida) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), *p. ej.*, como se describe en la patente de los EE. UU. núm. 6.194.551, WO 99/51642, e Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

5 Las moléculas de unión con vidas medias aumentadas y unión mejorada al receptor neonatal de Fc (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), se describen en US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Aquellas moléculas comprenden una región Fc con una o más sustituciones en ella que mejoran la unión de la región Fc a

10 FcRn. Tales variantes Fc incluyen aquellas con sustituciones a uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, *p. ej.*, sustitución del residuo 434 de la región Fc (patente de los EE. UU. núm. 7.371.826). Ver también Duncan & Winter, *Nature* 322: 738-40 (1988); patente de los EE. UU. núm. 5.648.260; patente de los EE. UU. núm.

15 5.624.821; y WO 94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

En algunas modalidades, puede ser deseable crear anticuerpos diseñados por ingeniería de cisteína, en los que uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen con residuos de cisteína. En algunas modalidades, los residuos sustituidos se producen en lugares accesibles del anticuerpo. Al sustituir esos residuos con

20 cisteína, los grupos tiol reactivos se colocan de esta manera en sitios accesibles del anticuerpo y pueden usarse para conjugar el anticuerpo con otras entidades, tales como entidades de fármacos o entidades de fármacos enlazantes, para crear un inmunoconjugado, como se describe adicionalmente en la presente descripción.

Sustituciones, deleciones o inserciones

Las variaciones pueden ser una sustitución, deleción o inserción de uno o más codones que codifican el anticuerpo o polipéptido, lo que resulta en un cambio en la secuencia de aminoácidos en comparación con el anticuerpo o polipéptido original.

- 5 Los sitios de interés para la mutagénesis sustitucional incluyen los CDR y los FR.

Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de sustituir un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, tales como el reemplazo de una leucina con una serina, p. ej., reemplazos conservadores de aminoácidos. Las técnicas estándar conocidas por los expertos en la

10 técnica pueden usarse para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica una molécula proporcionada en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR, que resulta en sustituciones de aminoácidos. Las inserciones o deleciones pueden, opcionalmente, estar en el rango de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. En ciertas modalidades, la

15 sustitución, deleción o inserción incluye menos de 25 sustituciones de aminoácidos, menos de 20 sustituciones de aminoácidos, menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos o menos de 2 sustituciones de aminoácidos en relación con la molécula

20 original. En una modalidad específica, la sustitución es una sustitución conservadora de aminoácidos elaborada en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales previstos. La variación permitida puede determinarse al realizar sistemáticamente inserciones,

deleciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y evaluación de las variantes resultantes para la actividad exhibida por los anticuerpos parentales.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones en el extremo amino- y/o carboxilo-terminal que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen múltiples residuos, así como inserciones de intrasecuencia de residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionil que termina en N.

Los anticuerpos generados por sustituciones conservadoras de aminoácidos se incluyen en la presente descripción. En una sustitución conservadora de aminoácidos, un residuo de aminoácido se sustituye con un residuo de aminoácidos que tiene una cadena lateral con una carga similar. Como se describió anteriormente, se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares en las cadenas laterales ácidas (*p. ej.*, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales acídicas (*p. ej.*, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (*p. ej.*, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (*p. ej.*, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta ramificadas (*p. ej.*, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (*p. ej.*, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Alternativamente, las mutaciones pueden introducirse aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante, tal como mediante mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes pueden analizarse para determinar la actividad biológica para identificar mutantes que retienen actividad. Después de la mutagénesis, puede expresarse la proteína codificada y puede determinarse la actividad de la proteína. Se pueden realizar

sustituciones conservadoras (*p. ej.*, dentro de un grupo de aminoácidos con propiedades similares y/o cadenas laterales), para mantener o no cambiar significativamente las propiedades. Las sustituciones ilustrativas se muestran en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2. Sustituciones de aminoácidos

Residuo Original	Sustituciones Ilustrativas	Residuo Original	Sustituciones Ilustrativas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys (K)	Arg; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Met (M)	Leu; Phe; Ile
Asp (D)	Glu; Asn	Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Cys (C)	Ser; Ala	Pro (P)	Ala
Gln (Q)	Asn; Glu	Ser (S)	Tre
Glu (E)	Asp; Gln	Thr (T)	Val; Ser
Gly (G)	Ala	Trp (W)	Tyr; Phe
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina

5 Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (*ver, p. ej.*, Lehninger, Biochemistry 73-75 (2.^a edición, 1975)): (1) no polares: Ala (a), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M); (2) polares sin carga: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q); (3) ácidos: Asp (D), Glu (E); y (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H). Alternativamente, los

10 residuos de origen natural pueden dividirse en grupos basados en las propiedades comunes de cadena lateral: (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) ácidos: Asp, Glu; (4) básicos: His, Lys, Arg; (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe. Por ejemplo, cualquier residuo de cisteína no involucrado en mantener la

conformación adecuada del anticuerpo también puede sustituirse, por ejemplo, con otro aminoácido, tal como alanina o serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y para prevenir la reticulación anormal. Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

5 Un tipo de variante sustitucional implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo progenitor (*p. ej.*, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para estudios adicionales tendrá(n) modificaciones (*p. ej.*, mejoras) en ciertas propiedades biológicas (*p. ej.*, mayor afinidad, inmunogenicidad reducida) en relación con el anticuerpo progenitor y/o

10 retendrá sustancialmente ciertas propiedades biológicas del anticuerpo progenitor. Una variante sustitutiva ilustrativa es un anticuerpo madurado por afinidad, que puede generarse convenientemente, *p. ej.*, usando técnicas de maduración por afinidad basadas en exhibición de fagos tales como las descritas en la presente descripción. Brevemente, uno o más residuos de CDR se mutan y los anticuerpos variantes se exhiben en fago y se

15 analizan para determinar una actividad biológica particular (*p. ej.*, afinidad de unión).

 Pueden hacerse alteraciones (*p. ej.*, sustituciones) en CDR, *p. ej.*, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Tales alteraciones pueden hacerse en “puntos críticos” de CDR, *es decir*, residuos codificados por codones que experimentan mutación a alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (*ver, p. ej.*, Chowdhury,

20 *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), y/o SDR (a-CDR), con el anticuerpo variante resultante o fragmento de este que se prueba para determinar la afinidad de unión. Se ha descrito la maduración por afinidad mediante la construcción y reelección a partir de genotecas secundarias, *p. ej.*, en Hoogenboom et al. en *Methods in Molecular Biology*

178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). En algunas modalidades de maduración por afinidad, la diversidad se introduce en los genes variables elegidos para maduración por cualquiera de una variedad de métodos (*p. ej.*, PCR propensa a errores, reordenamiento de cadenas, o mutagénesis dirigida a oligonucleótidos). Después, se crea una genoteca secundaria. La genoteca se analiza después para identificar cualesquier variantes de anticuerpos con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad implica enfoques dirigidos por CDR, en los cuales se aleatorizan varios residuos de CDR (*p. ej.*, 4-6 residuos por vez). Los residuos de CDR involucrados en la unión al antígeno pueden identificarse específicamente, *p. ej.*, usando mutagénesis o modelado por barrido de alanina. En la sección a continuación se proporciona una descripción más detallada con respecto a la maduración por afinidad.

En algunas modalidades, las sustituciones, inserciones o deleciones pueden ocurrir dentro de una o más CDR siempre que tales alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Por ejemplo, las alteraciones conservadoras (*p. ej.*, sustituciones conservadoras como se proporcionan en la presente descripción) que no reducen sustancialmente la afinidad de unión pueden realizarse en las CDR. En algunas modalidades de las secuencias de anticuerpos variantes proporcionadas en la presente descripción, cada CDR no se altera, o contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un método útil para identificar residuos o regiones de un anticuerpo que pueden ser objeto de mutagénesis se denomina “mutagénesis de exploración de alanina”, como se describe en Cunningham y Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989). En este método, un residuo o grupo de residuos diana (*p. ej.*, residuos cargados tales como Arg, Asp, His, Lys,

y Glu) se identifican y reemplazan por un aminoácido cargado neutral o negativamente (p. ej., alanina o polialanina) para determinar si se afecta la interacción del anticuerpo con el antígeno. Pueden introducirse sustituciones adicionales en las ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Alternativa o

- 5 adicionalmente, una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales residuos de contacto y residuos vecinos pueden dirigirse o eliminarse como candidatos para la sustitución. Las variantes pueden analizarse para determinar si contienen las propiedades deseadas.

- Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones en el extremo
- 10 amino- y/o carboxilo-terminal que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen múltiples residuos, así como inserciones de intrasecuencia de residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionil que termina en N. Otras variantes insercionales de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al N- o C-terminal del anticuerpo a una enzima
- 15 (*p. ej.*, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la vida media sérica del anticuerpo.

- Las variaciones pueden realizarse mediante métodos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis (dirigida al sitio) mediada por oligonucleótidos, exploración con alanina y mutagénesis por PCR. Mutagénesis dirigida al sitio (*ver, p. ej.*, Carter, Biochem J. 237: 1-7 (1986); y Zoller *et al.*, Nucl. Acids Res. 10: 6487-500
- 20 (1982)), mutagénesis por inserción de un casete (*ver, p. ej.*, Wells *et al.*, Gene 34: 315-23 (1985)), u otras técnicas conocidas pueden realizarse en el ADN clonado para producir el ADN de la variante del anticuerpo.

Mutaciones del Fc

Para facilitar la formación de un heterodímero entre las dos cadenas pesadas, p. ej., una con una fusión del anticuerpo anti-IL-1 β o fragmento de unión al antígeno de este y una sin, o una que contiene la Fc para el brazo anti-IL-1 β y una para el brazo diana de tejido, mutaciones heterodiméricas introducidas en la Fc de las dos cadenas pesadas. Los ejemplos de tales mutaciones de Fc incluyen, pero no se limitan a, las mutaciones de Zymework (ver, p. ej., US 10.457.742) y las mutaciones de “perilla en el agujero” (ver, p. ej., Ridgway et al., Protein Eng., 9(7): 617-621, 1996). También pueden usarse otras mutaciones heterodiméricas en la presente descripción. En algunas modalidades, un CH3 modificado como se describe en la presente descripción se usa para facilitar la formación de un heterodímero entre las dos cadenas pesadas.

En una modalidad específica, cada una de las dos cadenas pesadas del anticuerpo comprende una o más mutaciones heterodiméricas o una o más mutaciones de botón y ojal. En una modalidad específica, la una o más mutaciones heterodiméricas se encuentran en el dominio CH3.

En ciertas modalidades, la región Fc del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este contiene sustituciones que alteran la unión del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este al receptor de Fc neonatal (FcRn). En ciertas modalidades, la región Fc del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este contiene sustituciones que mejoran la unión del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este al receptor de Fc neonatal (FcRn). En ciertas modalidades, la región Fc del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este contiene sustituciones que mejoran la unión del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este al receptor de Fc neonatal (FcRn) al pH ~ 6. En

ciertas modalidades, la región Fc del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este contiene sustituciones que mejoran la unión del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este al receptor Fc neonatal (FcRn) al pH ~6, mejorando así el reciclaje endosomal mediado por FcRn. En ciertas modalidades, la región Fc del anticuerpo o

5 fragmento de unión al antígeno de este contiene sustituciones que mejoran la unión del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este al receptor Fc neonatal (FcRn) al pH ~6, lo que conduce a una exposición sérica más prolongada. En ciertas modalidades, la región Fc del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este contiene sustituciones que mejoran la unión a un pH ácido. En ciertas modalidades, la región Fc del anticuerpo o

10 fragmento de unión al antígeno de este tiene las mutaciones M252Y/S254T/T256E (YTE), en donde la numeración de residuos de aminoácidos es según el índice de la EU.

5.2.5. Maduración de afinidad *in vitro*

En algunas modalidades, las variantes de anticuerpo que tienen una propiedad mejorada tal como afinidad, estabilidad o nivel de expresión en comparación

15 con un anticuerpo parental pueden prepararse mediante maduración de afinidad *in vitro*. Al igual que el prototipo natural, la maduración de afinidad *in vitro* se basa en los principios de mutación y selección. Las genotecas de anticuerpos se exhiben en la superficie de un organismo (*p. ej.*, fagos, bacterias, levaduras o células de mamífero) o en asociación (*p. ej.*, covalente o no covalentemente) con su ARNm o ADN codificante.

20 La selección por afinidad de los anticuerpos exhibidos permite el aislamiento de organismos o complejos que transportan la información genética que codifica los anticuerpos. Dos o tres rondas de mutación y selección mediante métodos de exhibición, tales como exhibición de fagos, usualmente resulta en fragmentos de anticuerpo con

afinidades en el rango nanomolar bajo. Los anticuerpos madurados por afinidad pueden tener afinidades nanomolares o, incluso, picomolares para el antígeno objetivo.

La exhibición de fagos es un método generalizado para exhibir y seleccionar anticuerpos. Los anticuerpos se muestran en la superficie de bacteriófagos Fd o M13 como fusiones a la proteína de la cubierta del bacteriófago. La selección implica la exposición al antígeno para permitir que los anticuerpos exhibidos por fagos se unan a sus objetivos, un proceso denominado “adsorción”. El fago unido al antígeno se recupera y se usa para infectar una bacteria para producir fagos para rondas de selección adicionales. Para su revisión, ver, por ejemplo, Hoogenboom, *Methods. Mol. Biol.* 178:1-37 (2002); y Bradbury and Marks, *J. Immunol. Methods* 290:29-49 (2004).

En un sistema de exhibición de levadura (*ver, p. ej., Boder et al., Nat. Biotech.* 15:553–57 (1997); y Chao *et al.*, 2006, *Nat. Protocols* 1: 755-68), el anticuerpo puede fusionarse con la subunidad de adhesión de la proteína de aglutinina de levadura Aga2p, que se une a la pared celular de la levadura a través de enlaces disulfuro a Aga1p. La exhibición de una proteína por medio de Aga2p lanza la proteína lejos de la superficie celular, lo que minimiza las interacciones potenciales con otras moléculas en la pared celular de la levadura. La separación magnética y la citometría de flujo se usan para examinar la genoteca para seleccionar los anticuerpos con afinidad o estabilidad mejorada. La unión a un antígeno soluble de interés se determina mediante el marcado de levadura con antígeno biotinilado y un reactivo secundario tal como estreptavidina conjugada con un fluoróforo. Las variaciones en la expresión de superficie del anticuerpo pueden medirse mediante el marcado por inmunofluorescencia de la etiqueta de hemaglutinina o epítipo c-Myc que flanquea el anticuerpo de cadena simple (*p. ej., scFv*). Se ha demostrado que la

expresión se correlaciona con la estabilidad de la proteína exhibida y, por lo tanto, se pueden seleccionar anticuerpos para mejorar la estabilidad y la afinidad (*ver, p. ej., Shusta et al., J. Mol. Biol.* 292:949-56 (1999)). Una ventaja adicional de la exhibición de levadura es que las proteínas exhibidas se pliegan en el retículo endoplasmático de las células de levadura eucariotas, sacando provecho de las chaperonas de retículo endoplásmico y la maquinaria de control de calidad. Una vez que se completa la maduración, la afinidad del anticuerpo puede “titularse” convenientemente mientras se exhibe en la superficie de la levadura, lo que elimina la necesidad de expresión y purificación de cada clon. Una limitación teórica de la exhibición de la superficie de levadura es el tamaño de genoteca funcional potencialmente menor que el de otros métodos de exhibición; sin embargo, un reciente enfoque usa el sistema de unión de células de levadura para crear diversidad combinatoria estimada en 10^{14} de tamaño (*ver, p. ej.,* publicación de patente de los EE. UU. núm. 2003/0186374; y Blaise *et al.*, 2004, *Gene* 342: 211–18 (2004)).

En la exhibición de ribosomas, los complejos de ARNm de ribosomas de anticuerpos (ARM, por sus siglas en inglés) se generan para la selección en un sistema libre de células. La genoteca de ADN que codifica una genoteca particular de anticuerpos se fusiona genéticamente a una secuencia espaciadora que carece de un codón de terminación. Esta secuencia espaciadora, cuando se traduce, está todavía unida al ARNt de peptidilo y ocupa el túnel ribosómico, y por lo tanto permite que la proteína de interés sobresalga del ribosoma y se pliegue. El complejo resultante de ARNm, ribosoma y proteína puede unirse al ligando unido a la superficie, lo que permite el aislamiento simultáneo del anticuerpo y su ARNm codificante a través de la captura de afinidad con el ligando. El ARNm unido al ribosoma se transcribe inversamente en ADNc, que

después puede sufrir mutagénesis y usarse en la siguiente ronda de selección (*ver, p. ej.*, Fukuda *et al.*, Nucleic Acids Res. 34:e127 (2006)). En la exhibición del ARNm, un enlace covalente entre el anticuerpo y el ARNm se establece usando una puromicina como una molécula adaptadora (Wilson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:3750-55 (2001)).

5 Dado que estos métodos se realizan totalmente *in vitro*, proporcionan dos ventajas principales en comparación con otras tecnologías de selección. En primer lugar, la diversidad de la genoteca no está limitada por la eficiencia de transformación de células bacterianas, sino solo por el número de ribosomas y diferentes moléculas de ARNm presentes en el tubo de ensayo. Segundo, pueden introducirse mutaciones
10 aleatorias fácilmente después de cada ronda de selección, por ejemplo, mediante polimerasas sin corrección de errores, ya que ninguna genoteca puede transformarse después de cualquier etapa de diversificación.

En algunas modalidades, pueden usarse sistemas de exhibición de mamíferos.

La diversidad también puede introducirse en las CDR de las genotecas de
15 anticuerpos de manera dirigida o por medio de una introducción aleatoria. El primer enfoque incluye dirigirse secuencialmente a todas las CDR de un anticuerpo por medio de un alto o bajo nivel de mutagénesis o dirigirse a puntos calientes aislados de hipermutaciones somáticas (*ver, p. ej.*, Ho *et al.*, J. Biol. Chem. 280:607-17 (2005)) o residuos sospechosos de afectar a la afinidad con carácter experimental o por razones
20 estructurales. La diversidad también puede introducirse mediante el reemplazo de regiones que son naturalmente diversas por medio del barajado de ADN o técnicas similares (*ver, p. ej.*, Lu *et al.*, J. Biol. Chem. 278:43496-507 (2003); las patentes de los EE. UU. núms. 5.565.332 y 6.989.250). Las técnicas alternativas se dirigen a bucles

hipervariables que se extienden hacia los residuos de la región marco (*ver, p. ej., Bond et al., J. Mol. Biol. 348:699-709 (2005)*) emplean deleciones e inserciones de bucle en las CDR o usan la diversificación basada en la hibridación (*ver, p. ej., publicación de patente de los EE. UU. núm. 2004/0005709*). Se describen métodos adicionales para
5 generar diversidad en las CDR, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. núm. 7.985.840. Otros métodos que pueden usarse para generar genotecas de anticuerpos y/o maduración de afinidad de anticuerpos se describen, p. ej., en las patentes de los EE. UU. núms. 8.685.897 y 8.603.930, y las publicaciones de los EE. UU. núms. 2014/0170705, 2014/0094392, 2012/0028301, 2011/0183855 y 2009/0075378, cada
10 una de las cuales se incorpora en la presente descripción como referencia.

El análisis de las genotecas puede realizarse mediante diversas técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos pueden inmovilizarse en soportes sólidos, columnas, pasadores o membranas/otros filtros de celulosa/poli (fluoruro de vinilideno), pueden expresarse en células huésped fijadas a las placas de
15 adsorción o usarse en la clasificación celular, o conjugarse con biotina para la captura con perlas recubiertas con estreptavidina o usarse en cualquier otro método de adsorción de genotecas de exhibición.

Para la revisión de los métodos de maduración por afinidad *in vitro*, *ver, p. ej.,* Hoogenboom, Nature Biotechnology 23: 1105-16 (2005); Quiroz and Sinclair, Revista
20 Ingenieria Biomedica 4:39-51 (2010); y bibliografía citada en la presente descripción).

5.2.6. Modificaciones de anticuerpos

Las modificaciones covalentes de anticuerpos se incluyen dentro del alcance de la presente descripción. Las modificaciones covalentes incluyen la reacción de los

residuos de aminoácidos dirigidos de un anticuerpo con un agente de derivación orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos de extremo N-terminal o C-terminal del anticuerpo. Otras modificaciones incluyen la desamidación de los residuos de glutaminil y asparaginil a los correspondientes residuos de glutamil y aspartil, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de seril o treonil, la metilación de los grupos α -amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (*ver, p. ej.*, Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties 79-86 (1983)), acetilación de la amina de extremo N-terminal, y amidación de cualquier grupo carboxilo de extremo C-terminal.

Otros tipos de modificación covalente del anticuerpo incluidos en el alcance de la presente descripción incluyen la alteración del patrón de glicosilación nativo del anticuerpo o polipéptido como se describió anteriormente (*ver, p. ej.*, Beck *et al.*, Curr. Farm. Biotechnol. 9:482-501 (2008); y Walsh, Drug Discov. Today 15: 773-80 (2010)), y la unión del anticuerpo a uno de una variedad de polímeros no proteináceos, *p. ej.*, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera que se expone, por ejemplo, en las patentes de los EE. UU. núms. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192; o 4.179.337. El anticuerpo que se une a IL-1 β de la descripción puede también fusionarse o conjugarse genéticamente con una o más regiones constantes de inmunoglobulina o porciones de estas (*p. ej.*, Fc) para extender la vida media y/o para impartir funciones efectoras mediadas por Fc conocidas.

El anticuerpo que se une a IL-1 β de la presente descripción también puede modificarse para formar moléculas quiméricas que comprenden el anticuerpo que se une a IL1 β fusionado a otro, polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos, por

ejemplo, una etiqueta de epítipo (*ver, p. ej.*, Terpe, Appl. Microbiol. Biotechnol. 60: 523-33 (2003)) o la región Fc de una molécula de IgG (*ver, p. ej.*, Aruffo, Antibody Fusion Proteins 221-42 (Chamow and Ashkenazi eds., 1999)).

También se proporcionan, en la presente descripción, proteínas de fusión
5 que comprenden el anticuerpo que se une a IL-1 β de la descripción y un polipéptido heterólogo. En algunas modalidades, el polipéptido heterólogo al que el anticuerpo se fusiona genéticamente o se conjuga químicamente, es útil para dirigir el anticuerpo a las células cuya superficie celular expresa IL-1 β .

También se proporcionan, en la presente descripción, paneles de anticuerpos
10 que se unen a un antígeno IL-1 β . En modalidades específicas, los paneles de anticuerpos tienen diferentes tasas de asociación, diferentes tasas de disociación, diferentes afinidades para un antígeno IL-1 β , y/o diferentes especificidades para un antígeno IL-1 β . En algunas modalidades, los paneles comprenden o consisten en aproximadamente 10 a aproximadamente 1000 anticuerpos o más. Los paneles de anticuerpos pueden usarse,
15 por ejemplo, en placas de 96 pocillos o 384 pocillos, para ensayos tales como ELISA.

5.2.7. Otras moléculas de unión que comprenden los anticuerpos

En otro aspecto, en la presente descripción se proporciona una molécula de unión que comprende un anticuerpo anti-IL-1 β proporcionado en la presente descripción. En algunas modalidades, un anticuerpo contra IL-1 β proporcionada en la
20 presente descripción es parte de otras moléculas de unión. Las moléculas de unión ejemplares de la presente descripción se describen en la presente descripción.

Proteínas de fusión

En varias modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción puede fusionarse genéticamente o conjugarse químicamente a otro agente, por ejemplo, entidades a base de proteínas. El anticuerpo puede conjugarse químicamente con el agente, o de otra manera conjugarse no covalentemente con el agente. El agente puede ser un péptido o anticuerpo (o un fragmento de este).

Por lo tanto, en algunas modalidades, se proporcionan en la presente descripción anticuerpos que se fusionan recombinantemente o se conjugan químicamente (conjugaciones covalentes o no covalentes) con una proteína o polipéptido heterólogos (o fragmento de este, por ejemplo, con un polipéptido de aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 250, aproximadamente 300, aproximadamente 350, aproximadamente 400, aproximadamente 450 o aproximadamente 500 aminoácidos, o más de 500 aminoácidos) para generar proteínas de fusión, así como usos de estas. En particular, en la presente descripción se proporcionan proteínas de fusión que comprenden un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo proporcionado en la presente descripción (*p. ej.*, CDR1, CDR2 y/o CDR3) y una proteína, polipéptido o péptido heterólogos.

Además, los anticuerpos proporcionados en la presente descripción pueden fusionarse a marcadores o secuencias “etiqueta”, tal como un péptido, para facilitar la purificación. En modalidades específicas, el marcador o la secuencia de

aminoácidos de la etiqueta es un péptido hexa-histidina, una etiqueta de hemaglutinina (“HA”) y una etiqueta “FLAG”.

Se conocen métodos para fusionar o conjugar entidades (que incluyen polipéptidos) con anticuerpos (ver, p. ej., Arnon et al., *Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy*, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* 243-56 (Reisfeld et al. editores, 1985); Hellstrom et al., *Antibodies for Drug Delivery*, in *Controlled Drug Delivery* 623-53 (Robinson et al. editores., 2.^a ed. 1987); Thorpe, *Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review*, in *Monoclonal Antibodies: Biological and Clinical Applications* 475-506 (Pinchera et al. eds., 1985); Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy, in *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy* 303-16 (Baldwin et al. eds., 1985); Thorpe et al., *Immunol. Rev.* 62: 119-58 (1982); las patentes de los EE. UU. núms. 5.336.603; 5.622.929; 5.359.046; 5.349.053; 5.447.851; 5.723.125; 5.783.181; 5.908.626; 5.844.095; y 5.112.946; EP 307.434; EP 367.166; EP 394.827; publicaciones PCT WO 91/06570, WO 96/04388, WO 96/22024, WO 97/34631 y WO 99/04813; Ashkenazi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 10535-39 (1991); Traunecker et al., *Nature*, 331: 84-86 (1988); Zheng et al., *J. Immunol.* 154:5590-600 (1995); y Vil et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11337-41 (1992)).

Las proteínas de fusión pueden generarse, por ejemplo, a través de las técnicas de barajado de genes, barajado de motivos, barajado de exones y/o barajado de codones (conocidos colectivamente como “barajado de ADN”). El barajado de ADN puede emplearse para alterar las actividades de los anticuerpos, como se proporciona en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, anticuerpos con mayores

afinidades y menores tasas de disociación (ver, *p. ej.*, patentes de los EE. UU. núms. 5.605.793; 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252; y 5.837.458; Patten et al., Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-33 (1997); Harayama, Trends Biotechnol. 16(2):76-82 (1998); Hansson et al., 1999, J. Mol. Biol. 287:265-76 (1999); y Lorenzo and Blasco, Biotechniques 24(2): 308-13 (1998)). Los anticuerpos, o los anticuerpos codificados, pueden alterarse al someterse a mutagénesis aleatoria mediante la PCR propensa a errores, la inserción de nucleótidos aleatoria u otros métodos antes de la recombinación. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo proporcionado en la presente descripción puede recombinarse con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

En algunas modalidades, un anticuerpo proporcionado en la presente descripción se conjuga con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo.

En varias modalidades, el anticuerpo se fusiona genéticamente al agente. La fusión genética puede lograrse al colocar un enlazador (*p. ej.*, un polipéptido) entre el anticuerpo y el agente. El enlazador puede ser un enlazador flexible.

En varias modalidades, el anticuerpo se conjuga genéticamente con una molécula terapéutica, con una región bisagra que enlaza el anticuerpo con la molécula terapéutica.

En la presente descripción, también se proporcionan métodos para elaborar diversas proteínas de fusión proporcionadas en la presente descripción. Los diversos métodos descritos en la Sección 5.4 también pueden utilizarse para producir proteínas de fusión proporcionadas en la presente descripción.

En una modalidad específica, la proteína de fusión proporcionada en la presente descripción se expresa de manera recombinante. La expresión recombinante de una proteína de fusión proporcionada en la presente descripción puede requerir la construcción de un vector de expresión que contenga un polinucleótido que codifica la proteína o un fragmento de esta. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una proteína proporcionada en la presente descripción o un fragmento de esta, el vector para la producción de la molécula puede producirse mediante la tecnología de ADN recombinante usando técnicas muy conocidas en la técnica. Por lo tanto, en la presente descripción se describen métodos para preparar una proteína al expresar un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos codificante. Los métodos conocidos por los expertos en la técnica pueden usarse para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes y señales apropiadas de control transcripcional y traduccional. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. También se proporcionan vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión proporcionada en la presente descripción, o un fragmento de esta, o una CDR, enlazada operativamente a un promotor.

El vector de expresión puede transferirse a una célula huésped mediante técnicas convencionales, y las células transfectadas se cultivan, después, mediante técnicas convencionales para producir una proteína de fusión proporcionada en la presente descripción. Por lo tanto, en la presente descripción también se proporcionan células huésped que contienen un polinucleótido que codifica una

proteína de fusión proporcionada en la presente descripción, o fragmentos de esta, enlazada operativamente a un promotor heterólogo.

Se puede utilizar una variedad de sistemas de vectores de expresión del huésped para expresar la proteína de fusión proporcionada en la presente descripción.

- 5 Tales sistemas de expresión del huésped representan vehículos mediante los cuales las secuencias de codificación de interés pueden producirse y, posteriormente, purificarse; pero también representan células que, cuando se transforman o transfectan con las secuencias de codificación de nucleótidos apropiadas, expresan una proteína de fusión proporcionada en la presente descripción *in situ*. Estas incluyen, pero no se limitan a,
- 10 microorganismos tales como bacterias (p. ej., *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófagos recombinante, ADN de plásmidos o ADN de cósmidos que contienen secuencias codificantes; levadura (p. ej., *Saccharomyces Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinante que contienen secuencias codificantes; sistemas de células de insectos infectados con vectores de
- 15 expresión de virus recombinante (p. ej., baculovirus) que contienen secuencias codificantes; sistemas de célula vegetal infectada con vectores de expresión de virus recombinante (p. ej., virus mosaico de la coliflor, CaMV, virus mosaico del tabaco, TMV) o transformada con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (p. ej., plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes; o sistemas de célula de mamíferos (p. ej., células
- 20 COS, CHO, BHK, 293, NS0 y 3T3) que albergan constructos de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (p. ej., promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (p. ej., el promotor tardío de adenovirus; el promotor del virus vaccinia de 7.5 K). Las células bacterianas tales como *Escherichia coli*,

o células eucariotas, especialmente para la expresión de la molécula de anticuerpo recombinante completa, pueden usarse para la expresión de una proteína de fusión recombinante. Por ejemplo, las células de mamíferos tales como las células de ovario del hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés), junto con un vector como el principal
5 elemento promotor de gen temprano intermedio del citomegalovirus humano, es un sistema de expresión efectiva para anticuerpos o variantes de estos. En una modalidad específica, la expresión de secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de fusión proporcionadas en la presente descripción está regulada por un promotor constitutivo, promotor inducible o promotor específico de tejido.

10 En sistemas bacterianos, un número de vectores de expresión puede seleccionarse ventajosamente dependiendo del uso previsto para la proteína de fusión que se expresa. Por ejemplo, cuando una gran cantidad de tal proteína de fusión se producirá, para la generación de composiciones farmacéuticas de una proteína de fusión, pueden ser deseables los vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína
15 de fusión que se purifican fácilmente. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, el vector de expresión pUR278 de *E. coli* (Ruther, *et al.*, EMBO, 12: 1791 (1983)), en el cual la secuencia codificante puede ligarse individualmente en el vector en el marco con la región codificante lac Z de manera que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, J. Biol.
20 Chem. 24:5503-5509 (1989)); y lo similar. Los vectores pGEX también pueden usarse para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión 5-transferasa (GST). Generalmente, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de las células lisadas por adsorción y unión a una matriz de perlas de

glutación agarosa, seguida de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir sitios de escisión de proteasa de trombina o factor Xa de manera que el producto génico objetivo clonado puede liberarse de la entidad GST.

En las células huésped de mamíferos, pueden usarse varios sistemas de expresión de base viral. En los casos en que se usa un adenovirus como un vector de expresión, la secuencia codificante de interés puede estar ligada a un complejo de control de transcripción/traducción de adenovirus, p. ej., el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Después, este gen quimérico puede insertarse en el genoma de adenovirus mediante la recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (p. ej., región EI o E3) resultará en un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la proteína de fusión en huéspedes infectados (p. ej., ver Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1: 355-359 (1984)). Las señales de iniciación específicas podrían también ser necesarias para la traducción eficiente de las secuencias codificantes insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y las secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para garantizar la traducción de todo el inserto. Estas señales de control de traducción exógena y los codones de iniciación pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de expresión puede mejorarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de transcripción apropiados, terminadores de transcripción, *etc.* (ver, p. ej., Bittner *et al.*, Methods in Enzymol. 153:51-544 (1987)).

Además, puede elegirse una cepa de células huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico en la

forma específica deseada. Tales modificaciones (p. ej., glicosilación) y procesamiento (p. ej., escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Las diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y modificación posterior a la traducción de proteínas y productos

5 génicos. Las líneas celulares o sistemas huésped apropiados pueden seleccionarse para garantizar la modificación y procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Con este fin, pueden usarse las células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento adecuado del transcrito, glicosilación y fosforilación primarios del producto génico. Tales células huésped de mamífero incluyen, pero no se

10 limitan a, células CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT2O y T47D, NS0 (una línea celular de mieloma murino que no produce endógenamente ninguna cadena de inmunoglobulina), CRL7O3O y HsS78Bst.

Para la producción a largo plazo y de alto rendimiento de proteínas recombinantes, puede usarse la expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares

15 que expresan de manera estable las proteínas de fusión pueden modificarse. En lugar de usar vectores de expresión que contengan orígenes virales de replicación, las células huésped pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados (p. ej., promotor, potenciador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Después de

20 la introducción del ADN extraño, las células diseñadas por ingeniería pueden dejarse crecer en un medio enriquecido durante 1-2 días y, después, cambiarse con un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de manera estable el plásmido en sus

cromosomas y crezcan para formar focos que, a su vez, puedan clonarse y expandirse en las líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para diseñar líneas celulares que expresan la proteína de fusión. Tales líneas celulares diseñadas pueden ser particularmente útiles en la selección y evaluación de composiciones que

5 interactúan directa o indirectamente con la molécula de unión.

Pueden usarse una cantidad de sistemas de selección, que incluyen, pero no se limitan a, la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler, *et al.*, Cell, 11, 11:1977), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992)), y pueden emplearse genes de adenina

10 fosforibosiltransferasa (Lowy *et al.*, Cell 22:8-17 (1980)) en células tk-, hgp^rt- o ap^rt, respectivamente. Además, la resistencia antimetabolito puede usarse como la base de selección para los siguientes genes: *dhfr*, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler *et al.*, Natl. Acad. Sci. USA 77: 357 (1980); O'Hare *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)); *gpt*, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan &

15 Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Wu and Wu, Biotherapy 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan, Science 260: 926-932 (1993); y Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); May, TIB TECH 11(5): 155-2 15 (1993)); e *hygro*, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre *et al.*,

20 Gene 30:147 (1984)). Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante pueden aplicarse rutinariamente para seleccionar el clon recombinante deseado, y tales métodos se describen, por ejemplo, en Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993);

Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli *et al.* (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin *et al.*, J. Mol. Biol. 150:1 (1981), que se incorporan en la presente descripción como referencia en su totalidad.

5 El nivel de expresión de una proteína de fusión puede aumentarse mediante amplificación de vectores (para una revisión, ver Bebbington and Hentschel) The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema de vectores que expresa una proteína de fusión es
10 amplificable, el aumento en el nivel del inhibidor presente en el cultivo de células huésped hará aumentar el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada se asocia con el gen de la proteína de fusión, la producción de la proteína de fusión también aumentará (Crouse *et al.*, Mol. Cell. Biol. 3:257 (1983)).

 La célula huésped puede cotransfectarse con múltiples vectores de
15 expresión proporcionados en la presente descripción. Los vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la expresión igual de los respectivos polipéptidos codificantes. Alternativamente, puede usarse un vector único que codifica y es capaz de expresar múltiples polipéptidos. Las secuencias codificantes pueden comprender ADNc o ADN genómico.

20 Una vez que una proteína de fusión proporcionada en la presente descripción se ha producido por expresión recombinante, puede purificarse mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de un polipéptido (p. ej., una molécula de inmunoglobulina), por ejemplo, mediante cromatografía (p. ej.,

intercambio de iones, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico después de la proteína A, cromatografía de columna por tamaño y cromatografía por afinidad KappaSelect), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, las moléculas de proteína de fusión proporcionadas en la presente descripción pueden fusionarse con las secuencias de polipéptidos heterólogos descritas en la presente descripción o, de cualquier otra manera, conocidas en la técnica para facilitar la purificación.

Inmunosconjugados

En algunas modalidades, la presente descripción también proporciona inmunosconjugados que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-IL-1 β descritos en la presente descripción conjugados con uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes quimioterapéuticos o fármacos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (p. ej., toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de estas), o isótopos radiactivos.

En algunas modalidades, un inmunosconjugado es un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés) en el que un anticuerpo se conjuga con uno o más fármacos, incluyendo, pero sin limitarse a, un maitansinoide (ver las patentes de los EE. UU. núms. 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1); una auristatina tal como entidades del fármaco monometilauristatina DE y DF (MMAE y MMAF) (ver las patentes de los EE. UU. núms. 5.635.483 y 5.780.588, y 7.498.298); una dolastatina; una caliqueamicina o derivado de esta (ver, p. ej., las patentes de los EE. UU. núms. 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 y 5.877.296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); y Lode et al., *Cancer Res.*

58:2925-2928 (1998)); una antraciclina tal como daunomicina o doxorubicina (ver Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16: 358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12: 1529-1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002); y la patente de los EE. UU. núm. 6.630.579); metotrexato; vindesina; un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; una tricoteceno; y CC1065.

En algunas modalidades, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo tal como se describe en la presente descripción conjugado con una toxina enzimáticamente activa o fragmento de esta, que incluye, pero sin limitarse a, una cadena A de difteria, fragmentos activos no unidos de toxina diftérica, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modecina A, alfa-sarcina, proteínas Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas Phytolaca americana (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

En algunas modalidades, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en la presente descripción conjugado con un átomo radioactivo para formar un radioconjugado. Existe una variedad de isótopos radiactivos disponibles para la producción de radioconjugados. Los ejemplos incluyen At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu. Cuando se usa el radioconjugado para la detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios de escintigrafía, por ejemplo tc99 m o 1123, o un marcador de espín para la formación de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN, por sus siglas en inglés) (también conocida como

imágenes de resonancia magnética, mri), tal como yodo-123 nuevamente, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los conjugados de un anticuerpo y agente citotóxico pueden realizarse usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como

5 N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tal como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y

10 compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta et al., *Science* 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminapentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante

15 ilustrativo para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Ver WO94/11026.

El enlazador puede ser un “enlazador escindible” que facilita la liberación del agente conjugado en la célula, pero enlazadores no escindibles también se contemplan en la presente descripción. Los enlazadores para usar en los conjugados de la presente descripción incluyen, sin limitación, enlazadores lábiles ácidos (*p. ej.*, enlazadores de

20 hidrazona), enlazadores que contienen disulfuro, enlazadores sensibles a la peptidasa (*p. ej.*, enlazadores peptídicos que comprenden aminoácidos, por ejemplo, valina y/o citrulina tal como citrulina-valina o fenilalanina-lisina), enlazadores fotolábiles,

enlazadores de dimetilo, enlazadores de tioéter o enlazadores hidrófilos diseñados para evadir la resistencia mediada por el transportador de múltiples fármacos.

Los inmunoconjugados o ADC en la presente descripción contemplan, pero no se limitan a tales conjugados preparados con reactivos reticulantes, pero no se limitan a

5 BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, and sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que se encuentran comercialmente disponibles (*p. ej.*, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A).

En otras modalidades, los anticuerpos proporcionados en la presente

10 descripción se conjugan o se fusionan recombinantemente, *p. ej.*, con una molécula de diagnóstico. Tal diagnóstico y detección puede lograrse, por ejemplo, mediante el acoplamiento del anticuerpo a sustancias detectables que incluyen, pero no se limitan a, diversas enzimas, tales como, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tales

15 como, pero no se limitan a, estreptavidina/biotina o avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero no se limitan a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como, pero no se limitan a, luminol; materiales bioluminiscentes, tales como, pero no se limitan a, luciferasa,

20 luciferina o aequorina; material quimioluminiscente, tal como un isótopo radioactivo emisor de Acy225, emisor de Auger, emisor de β , emisor de alfa u emisor de positrón.

5.3. Polinucleótidos

En ciertas modalidades, la descripción proporciona polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la presente que se unen a IL-1 β y proteínas de fusión que comprenden los anticuerpos que se unen a IL-1 β descrito en la presente descripción. Los polinucleótidos de la descripción pueden estar en la forma de ARN o en la forma de ADN. El ADN incluye ADNc, ADN genómico y ADN sintético; puede ser bicatenario o monocatenario, y si es monocatenario puede ser la cadena codificante o la cadena no codificante (antisentido). En algunas modalidades, el polinucleótido está en la forma de ADNc. En algunas modalidades, el polinucleótido es un polinucleótido sintético.

La presente descripción se relaciona además con variantes de los polinucleótidos descritos en la presente descripción, en donde la variante codifica, por ejemplo, fragmentos, análogos y/o derivados del anticuerpo que unen al IL-1 β de la descripción. En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un polinucleótido que comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos de al menos aproximadamente 75 % idéntica, al menos aproximadamente 80 % idéntica, al menos aproximadamente 85 % idéntica, al menos aproximadamente 90 % idéntica, al menos aproximadamente 95 % idéntica, y en algunas modalidades, al menos aproximadamente 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a un polinucleótido que codifica el anticuerpo que une al IL-1 β de la descripción. Como se usa en la presente descripción, la frase “un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, 95 % “idéntica” a una secuencia de nucleótidos de referencia” significa que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia, con la excepción de que la secuencia de polinucleótidos puede incluir hasta cinco mutaciones

puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta el 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia puede eliminarse o sustituirse con otro nucleótido, o varios nucleótidos hasta el 5 % del total de nucleótidos en la secuencia de referencia puede insertarse en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones terminales 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas ya sea individualmente entre nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

Las variantes de polinucleótidos pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, regiones no codificantes o ambas. En algunas modalidades, una variante de polinucleótido contiene alteraciones que producen sustituciones, adiciones o deleciones silenciosas, pero no altera las propiedades o actividades del polipéptido codificado. En algunas modalidades, una variante de polinucleótido comprende sustituciones silenciosas que resultan en ningún cambio a la secuencia de aminoácidos del polipéptido (debido a la degeneración del código genético). Las variantes de polinucleótidos pueden producirse por una variedad de razones, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones para un huésped particular (es decir, cambiar codones en el ARNm humano con los preferidos por un huésped bacteriano tal como *E. coli*). En algunas modalidades, una variante de polinucleótido comprende al menos una mutación silenciosa en una región no codificante o codificante de la secuencia.

En algunas modalidades, una variante de polinucleótido se produce para modular o alterar la expresión (o niveles de expresión) del polipéptido codificado. En algunas modalidades, una variante de polinucleótido se produce para aumentar la expresión del polipéptido codificado. En algunas modalidades, una variante de polinucleótido se produce para disminuir la expresión del polipéptido codificado. En algunas modalidades, una variante de polinucleótido tiene una mayor expresión del polipéptido codificado en comparación con una secuencia de polinucleótidos parental. En algunas modalidades, una variante de polinucleótido tiene una expresión reducida del polipéptido codificado en comparación con una secuencia de polinucleótidos parental.

Además, se proporcionan vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente descripción. En una modalidad, las moléculas de ácido nucleico pueden incorporarse en un vector de expresión recombinante. La presente descripción proporciona vectores de expresión recombinantes que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos de la descripción. Como se usa en la presente descripción, el término “vector de expresión recombinante” significa un constructo de oligonucleótidos o polinucleótidos modificado genéticamente que permite la expresión de un ARNm, proteína, polipéptido o péptido mediante una célula huésped, cuando el constructo comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el ARNm, proteína, polipéptido o péptido, y el vector entra en contacto con la célula bajo condiciones suficientes para que el ARNm, proteína, polipéptido o péptido se exprese dentro de la célula. Los vectores descritos en la presente descripción no son de origen natural como un todo; sin embargo, partes de los vectores pueden ser de origen natural. Los vectores de expresión recombinantes descritos pueden comprender cualquier tipo de nucleótidos,

que incluyen, pero no se limitan a, ADN y ARN, que pueden ser monocatenarios o bicatenarios, sintetizados u obtenidos en parte de fuentes naturales, y que pueden contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados. Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender enlaces internucleótidos de origen natural o de
 5 origen artificial, o ambos tipos de enlaces. Los enlaces de nucleótidos o internucleótidos de origen artificial o alterados no impiden la transcripción o replicación del vector.

En una modalidad, el vector de expresión recombinante de la descripción puede ser cualquier vector de expresión recombinante adecuado, y puede usarse para transformar o transfectar cualquier huésped adecuado. Los vectores adecuados incluyen
 10 los diseñados para propagación y expansión o para expresión o ambos, tales como plásmidos y virus. El vector puede seleccionarse del grupo que consiste en la serie pUC (Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, Md.), la serie pBluescript (Stratagene, LaJolla, Calif.), la serie pET (Novagen, Madison, Wis.), la serie pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y la serie pEX (Clontech, Palo Alto, Calif.). Pueden usarse vectores
 15 bacteriófagos, tales como λ GT10, λ GT11, λ EMBL4 y λ NM1149, λ ZapII (Stratagene). Los ejemplos de vectores de expresión vegetal incluyen pBI01, pBI01.2, pBI121, pBI101.3 y pBIN19 (Clontech). Los ejemplos de vectores de expresión animal incluyen pEUK-CI, pMAM y pMAMneo (Clontech). El vector de expresión recombinante puede ser un vector viral, p. ej., un vector retroviral, p. ej., un vector retroviral gamma.

20 En una modalidad, los vectores de expresión recombinantes se preparan mediante técnicas de ADN recombinante estándar descritas en, por ejemplo, Sambrook et al., supra, and Ausubel et al., supra. Los constructos de vectores de expresión, que son circulares o lineales, pueden prepararse para contener un sistema

de replicación funcional en una célula huésped procariota o eucariota. Los sistemas de replicación pueden derivarse, por ejemplo, de ColE1, SV40, plásmido 2 μ , λ , virus de papiloma bovino, y lo similar.

El vector de expresión recombinante puede comprender secuencias
5 reguladoras, tales como codones de iniciación y terminación de la transcripción y traducción, que sean específicas para el tipo de huésped (*p. ej.*, bacteria, planta, hongo o animal) en el cual se va a introducir el vector, según proceda, y tomando en consideración si el vector es a base de ADN o ARN.

El vector de expresión recombinante puede incluir uno o más genes
10 marcadores, que permiten la selección de huéspedes transformados o transfectados. Los genes marcadores incluyen resistencia biocida, *p. ej.*, resistencia a los antibióticos, metales pesados, etc., complementación en un huésped auxotrófico para proporcionar prototrofia, y lo similar. Los genes marcadores adecuados para los vectores de expresión descritos incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a la
15 neomicina/G418, genes de resistencia al histidinol X, genes de resistencia al histidinol, genes de resistencia a la tetraciclina y genes de resistencia a la ampicilina.

El vector de expresión recombinante puede comprender un promotor nativo o normativo enlazado operativamente a la secuencia de nucleótidos de la descripción. La selección de promotores, *p. ej.*, fuertes, débiles, específicos de tejidos, inducibles y
20 específicos del desarrollo, está dentro de la experiencia ordinaria del técnico.

Similarmente, la combinación de una secuencia de nucleótidos con un promotor también está dentro de la experiencia del experto. El promotor puede ser un promotor no viral o un promotor viral, *p. ej.*, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor

de RSV, un promotor de SV40, o un promotor hallado en la repetición del terminal largo del virus de células madre murinas.

Los vectores de expresión recombinantes pueden ser diseñados para expresión transitoria o para expresión estable, o para ambas. Además, los vectores de expresión
5 recombinantes pueden crearse para expresión constitutiva o para expresión inducible.

Además, los vectores de expresión recombinantes pueden crearse para incluir un gen suicida. Como se usa en la presente descripción, “gen suicida” se refiere a un gen que hace que la célula que expresa el gen suicida muera. El gen suicida puede ser un gen que confiere sensibilidad a un agente, *p. ej.*, un fármaco, en
10 la célula en la que el gen se expresa, y hace que la célula muera cuando la célula entra en contacto con o se expone al agente. Los genes suicidas se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, el gen timidina quinasa (TK) del Virus del Herpes simple (HSV), citosina desaminasa, purina-nucleósido fosforilasa y nitroreductasa.

En ciertas modalidades, se aísla un polinucleótido. En ciertas modalidades,
15 un polinucleótido es sustancialmente puro.

También se proporcionan células huésped que comprenden las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente descripción. La célula huésped puede ser cualquier célula que contiene un ácido nucleico heterólogo. El ácido nucleico heterólogo puede ser un vector (*p. ej.*, un vector de expresión). Por ejemplo, una célula huésped puede ser una
20 célula de cualquier organismo que es seleccionado, modificado, transformado, cultivado, usado o manipulado de cualquier manera, para la producción de una sustancia por la célula, por ejemplo, la expresión por la célula de un gen, una secuencia de ADN o ARN, una proteína o una enzima. Puede determinarse un huésped apropiado. Por ejemplo, la

célula huésped puede seleccionarse basada en la cadena principal del vector y el resultado deseado. A manera de ejemplo, un plásmido o cósmido pueden introducirse en una célula huésped procariota para la replicación de diversos tipos de vectores. Las células bacterianas tales como, pero no se limitan a, DH5 α , JM109 y KCB, células competentes SURE® y células SOLOPACK Gold, pueden usarse como células huésped para la replicación y/o expresión de vectores. Además, las células bacterianas, tales como *E. coli* LE392, podrían usarse como células huésped para virus de fagos. Las células eucariotas que pueden usarse como células huésped incluyen, pero no se limitan a, levadura (*p. ej.*, YPH499, YPH500 y YPH501), insectos y mamíferos. Los ejemplos de células huésped eucariotas de mamíferos para la replicación y/o expresión de un vector incluyen, pero no se limitan a, HeLa, NIH3T3, Jurkat, 293, COS, Saos, PC12, SP2/0 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, CRL-1581), NS0 (European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, UK, ECACC núm. 85110503), FO (ATCC CRL-1646) y líneas celulares murinas Ag653 (ATCC CRL-1580). Una línea celular de mieloma humano ilustrativa es la U266 (ATTC CRL-TIB-196). Otras líneas celulares útiles incluyen las derivadas de células de ovario de hámster chino (CHO), tales como CHO-K1SV (Lonza Biologics, Walkersville, MD), CHO-K1 (ATCC CRL-61) o DG44.

5.4. Preparación de anticuerpos y método de elaboración

Se han descrito métodos para preparar anticuerpos. *Ver, p. ej.*, Els Pardon et al, *Nature Protocol*, 9(3): 674 (2014). Los anticuerpos (tales como fragmentos scFv) pueden obtenerse usando métodos conocidos en la técnica, tal como la inmunización de una especie de *camélido* (como el camello o la llama) y la obtención de hibridomas a partir de ella, o mediante la clonación de una biblioteca de anticuerpos usando técnicas

de biología molecular conocidas en la técnica y la posterior selección por ELISA con clones individuales de bibliotecas no seleccionadas o usando la exhibición de fagos.

Los anticuerpos proporcionados en la presente descripción pueden producirse mediante células de cultivo transformadas o transfectadas con un vector que contiene

5 ácidos nucleicos que codifican anticuerpos. Las secuencias de polinucleótidos que codifican los componentes polipeptídicos del anticuerpo de la presente descripción pueden obtenerse mediante técnicas recombinantes estándar. Las secuencias de polinucleótidos deseadas pueden aislarse y secuenciarse a partir de células productoras de anticuerpos, tales como las células de hibridomas o células B. Alternativamente, los polinucleótidos

10 pueden sintetizarse mediante un sintetizador de nucleótidos o técnicas por PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en células huésped. Muchos vectores que están disponibles y se conocen en la técnica pueden usarse para el propósito de la presente descripción. La selección de un vector apropiado dependerá

15 principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que se insertarán en el vector y de la célula huésped particular que se transformará con el vector. Las células huésped adecuadas para expresar anticuerpos de la presente descripción incluyen los procariotas tales como arqueobacterias y eubacterias, que incluyen organismos gramnegativos o grampositivos, microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levadura, células de

20 invertebrados tales como células de insectos o plantas, y células de vertebrados tales como líneas celulares huésped de mamíferos. Las células huésped se transforman con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar

transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Los anticuerpos producidos por las células huésped se purificaron mediante métodos de purificación de proteínas estándar como se conoce en la técnica.

Los métodos para la producción de anticuerpos, que incluyen la

5 construcción, expresión y purificación de vectores, se describen en mayor detalle en Plückthun *et al.*, Antibody Engineering: Producing antibodies in Escherichia coli: From PCR to fermentation 203-52 (McCafferty *et al.* editores, 1996); Kwong y Rader, *E. coli Expression and Purification of Fab Antibody Fragments*, in Current Protocols in Protein Science (2009); Tachibana y Takekoshi, *Production of Antibody Fab*

10 *Fragments in Escherichia coli*, in Antibody Expression and Production (Al-Rubeai ed., 2011); y Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic (An ed., 2009).

Se contempla, por supuesto, que métodos alternativos, que son bien conocidos en la técnica, puedan emplearse para preparar anticuerpos anti-IL-1 β . Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos apropiada, o porciones de esta, puede producirse mediante

15 síntesis de péptidos directa usando técnicas de fase sólida (*ver, p. ej.*, Stewart *et al.*, Solid-Phase Peptide Synthesis (1969); y Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-54 (1963)). La síntesis de proteína *in vitro* puede realizarse mediante técnicas manuales o mediante automatización. Varias porciones del anticuerpo anti-IL-1 β pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse usando métodos químicos o enzimáticos para

20 producir el anticuerpo anti-IL-1 β deseado. Alternativamente, los anticuerpos pueden purificarse a partir de células o fluidos corporales, tales como leche, de un animal transgénico diseñado para expresar el anticuerpo, como se describe, por ejemplo, en las patentes de los EE. UU. núms. 5.545.807 y 5.827.690.

Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales generalmente se generan en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que sea inmunogénica en la especie a inmunizar, *p. ej.*, hemocianina de lapa californiana (KLH, por sus siglas en inglés), albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, usando un agente bifuncional o de derivatización, *p. ej.*, éster de maleimidobenzoílo sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), n-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son grupos alquilo independientemente inferiores. Los ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (lípidos A de monofosforilo, dicorinomicolato de trehalosa sintética). Un experto en la técnica puede seleccionar el protocolo de inmunización sin demasiada experimentación.

Por ejemplo, los animales se inmunizan contra el antígeno, los conjugados inmunógenos o los derivados combinando, *p. ej.*, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución intradérmica en múltiples sitios. Un mes después, los animales se repotencian con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en el adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a catorce días después, los animales se sangran y el suero se analiza para determinar el título de anticuerpos. Los animales se repotencian hasta que el título se estabiliza. Los conjugados también se pueden preparar en cultivo celular

recombinante como fusiones de proteínas. También, los agentes de agregación tales como alumbre son adecuados para mejorar la respuesta inmunitaria.

Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se obtienen de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, *es decir*, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural y/o modificaciones postraduccionales (*p. ej.*, isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades menores. Por lo tanto, el modificador “monoclonal” indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando el método de hibridoma descrito primero por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), o se puede preparar mediante métodos de ADN recombinante (patente de los EE. UU. núm. 4.816.567).

En el método de hibridoma, un animal huésped adecuado se inmuniza para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Después, los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como el polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986).

El agente inmunizante incluirá típicamente la proteína antigénica o una variante de fusión de esta. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), pp. 59-103. Las líneas celulares inmortalizadas suelen ser

células de mamíferos transformadas. Las células de hibridoma preparadas de esta manera se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado, que, preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Las células de mieloma inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan la producción estable de alto nivel de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como un medio HAT.

El medio de cultivo en el cual crecen las células de hibridoma se analiza para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se puede analizar para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno deseado. Dichas técnicas y ensayos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la afinidad de unión puede determinarse mediante el análisis de Scatchard de Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Una vez que se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse al limitar los procedimientos de dilución y cultivarse mediante métodos estándar (Goding, *supra*). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, D-MEM o medio RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico o suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulina tales como, por

ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales también pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente de los EE. UU. núm. 4.816.567, y como se ha descrito anteriormente. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (p. ej., usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transfectan en células huésped, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario del hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen proteína de inmunoglobulina para sintetizar anticuerpos monoclonales en tales células huésped recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican el anticuerpo incluyen a Skerra, *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256-262 (1993) and Plickthun, *Immunol. Revs.* 130:151-188 (1992).

En una modalidad adicional, los anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991). Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (rango nM) por barajado de cadenas (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas de

fagos muy grandes (Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia
5 codificante (patente de los EE. UU. núm. 4.816.567; Morrison, *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o uniendo covalentemente a la secuencia codificante la totalidad o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no inmunoglobulina. Tales polipéptidos no inmunoglobulina pueden sustituirse para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene
10 especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

Los anticuerpos quiméricos o híbridos también pueden prepararse *in vitro* usando métodos conocidos en química de proteínas sintéticas, incluidos los que involucran agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden
15 construirse usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

Producción recombinante en células procariotas

Las secuencias de ácido polinucleico que codifican los anticuerpos de la
20 presente descripción pueden obtenerse usando técnicas recombinantes estándar. Las secuencias de ácido polinucleico deseadas pueden aislarse y secuenciarse a partir de células productoras de anticuerpos, tales como las células de hibridoma. Alternativamente, los polinucleótidos pueden sintetizarse mediante un sintetizador de

nucleótidos o técnicas por PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en huéspedes procariotas. Muchos vectores que están disponibles y se conocen en la técnica pueden usarse para el propósito de la presente descripción. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que se insertarán en el vector y de la célula huésped particular que se transformará con el vector. Cada vector contiene varios componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótido heterólogo, o ambos) y su compatibilidad con la célula huésped particular en la que reside. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no se limitan a, un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión al ribosoma (RBS, por sus siglas en inglés), una secuencia señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

En general, los vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicón y de control que se derivan de especies compatibles con la célula huésped se usan en conexión con estos huéspedes. El vector lleva normalmente un sitio de replicación, así como secuencias de marcado que son capaces de proporcionar una selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, el *E. coli* se transforma típicamente usando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. Los ejemplos de derivados de pBR322 usados para la expresión de anticuerpos particulares se describen en detalle en Carter *et al.*, patente de los EE. UU. núm. 5.648.237.

Además, los vectores de fago que contienen secuencias de replicón y de control que son compatibles con el microorganismo huésped pueden usarse como

vectores de transformación en conexión con estos huéspedes. Por ejemplo, el bacteriófago tal como GEM™-11 puede utilizarse para hacer un vector recombinante que puede usarse para transformar células huésped susceptibles tales como *E. coli* LE392.

El vector de expresión de la presente solicitud puede comprender dos o
5 más pares de promotores-cistron, que codifican cada uno de los componentes polipeptídicos. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida localizada aguas arriba (5') de un cistrón que modula su expresión. Los promotores procariotas se encuentran típicamente en dos clases, inducible y constitutivo. El promotor inducible es un promotor que inicia niveles aumentados de transcripción del cistrón
10 bajo su control en respuesta a cambios en la condición del cultivo, *p. ej.*, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio de temperatura.

Se conocen bien un gran número de promotores reconocidos por una variedad de células huésped potenciales. El promotor seleccionado puede unirse operativamente al ADN cistrón que codifica el anticuerpo presente eliminando el promotor del ADN fuente
15 mediante la digestión enzimática de restricción e insertando la secuencia promotora aislada en el vector de la presente solicitud. Tanto la secuencia promotora nativa como muchos promotores heterólogos pueden usarse para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. En algunas modalidades, se utilizan promotores heterólogos, ya que generalmente permiten una mayor transcripción y mayores rendimientos de gen diana
20 expresado en comparación con el promotor de polipéptidos diana nativo.

Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen el promotor PhoA, los sistemas promotores de galactamasa y lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor *tac* o el *trc*. Sin embargo,

también son adecuados otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fago conocidos). Se han publicado sus secuencias de ácido nucleico, lo que permite a un trabajador experto ligarlos operativamente a cistrones que codifican el péptido diana (Siebenlist *et al.* *Cell* 20: 269 (1980)) usando enlazadores o adaptadores para suministrar cualquier sitio de restricción requerido.

En un aspecto, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de secuencia señal de secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN del polipéptido diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada para el propósito de esta invención debe ser una que sea reconocida y procesada (*es decir*, escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para las células huésped procariotas que no reconocen y procesan las secuencias señal nativas de los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal puede sustituirse por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o líderes de enterotoxina II termoestable (STII, por sus siglas en inglés), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP.

En algunas modalidades, la producción de los anticuerpos de acuerdo con la presente descripción puede ocurrir en el citoplasma de la célula huésped y, por lo tanto, no requiere la presencia de secuencias señal de secreción dentro de cada cistrón.

Ciertas cepas huésped (*p. ej.*, las cepas *E. coli* trxB^-) proporcionan condiciones de citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiendo así un plegado y conjunto adecuados de subunidades de proteínas expresadas.

Las células huésped procariotas adecuadas para expresar los anticuerpos de la presente descripción incluyen Archaeobacterias y Eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos. Ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (p. ej., *E. coli*), *Bacilli* (p. ej., *B. subtilis*), enterobacteria, especies de

5 *Pseudomonas* (p. ej. *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rizobio*, *Vitreoscilla* o *Paracoccus*. En algunas modalidades, se usan células gramnegativas. En una modalidad, se usan células *E. coli* como huéspedes. Ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen la cepa W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society

10 for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; ATCC, depósito núm. 27.325) y derivados de estos, incluyendo la cepa 33D3 que tiene genotipo W3110 AfhuA (AtonA) ptr3 lac lq lacL8 AompT A (nmpc-fepE) degP41 kan^R (patente de los EE. UU. núm. 5.639.635). Otras cepas y derivadas de estas, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31.608) también son adecuadas.

15 Estos ejemplos son ilustrativos más que limitantes. Los métodos para construir derivados de cualquiera de las bacterias mencionadas anteriormente que tienen genotipos definidos son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Bass *et al.*, *Proteins*, 8: 309-314 (1990). En general, es necesario seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en cuenta la replicabilidad del replicón en las células de una

20 bacteria. Por ejemplo, las especies de *E. coli*, *Serratia* o *Salmonella* pueden usarse adecuadamente como huésped cuando se usan plásmidos bien conocidos tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para suministrar el replicón.

Típicamente, la célula huésped debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas, y es deseable incorporar inhibidores de la proteasa adicionales en el cultivo celular.

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. La transformación significa introducir ADN en el huésped procariota de manera que el ADN sea replicable, ya sea como un elemento extracromosómico o por integrante cromosómica. Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se realiza usando técnicas estándar apropiadas para tales células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio se usa generalmente para células bacterianas que contienen barreras sustanciales de la pared celular. Otro método para la transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Otra técnica usada es la electroporación.

Las células procariotas usadas para producir los anticuerpos de la presente solicitud se cultivan en medios conocidos en la técnica y son adecuados para el cultivo de las células huésped seleccionadas. Ejemplos de medios adecuados incluyen caldo luria (LB, por sus siglas en inglés) más suplementos de nutrientes necesarios. En algunas modalidades, los medios también contienen un agente de selección, elegido en base a la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina al medio para el crecimiento de células que expresan el gen resistente a la ampicilina.

Cualquier suplemento necesario además de las fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato inorgánico también se puede incluir en concentraciones apropiadas introducidas solas o como una mezcla con otro suplemento o medio tal como una fuente de nitrógeno compleja. Opcionalmente, el medio de cultivo puede
5 contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioneritrol y ditioneritol. Las células huésped procariotas se cultivan a temperaturas y pH adecuados.

Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión de la presente solicitud, la expresión de proteínas se induce en condiciones adecuadas para la
10 activación del promotor. En un aspecto de la presente solicitud, se usan promotores de PhoA para controlar la transcripción de los polipéptidos. Por consiguiente, las células huésped transformadas se cultivan en un medio limitante de fosfato para la inducción. Preferiblemente, el medio limitante de fosfato es el medio C.R.A.P (ver, *p. ej.*, Simmons *et al.*, *J. Immunol. Methods* 263: 133-147 (2002)). Se puede usar una
15 variedad de otros inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, tal como se conoce en la técnica.

Los anticuerpos expresados de la presente descripción se secretan y se recuperan del periplasma de las células huésped. La recuperación de proteínas implica típicamente interrumpir el microorganismo, generalmente por medios tales como
20 choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez que las células se rompen, los residuos celulares o las células enteras se pueden eliminar mediante centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante cromatografía de resina de afinidad. Alternativamente, las proteínas pueden transportarse en el medio

de cultivo y aislarse en este. Las células pueden retirarse del cultivo y el sobrenadante de cultivo se filtra y se concentra para una purificación adicional de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden aislarse e identificarse adicionalmente usando métodos comúnmente conocidos tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés) y ensayo Western blot.

Alternativamente, la producción de proteínas se lleva a cabo en gran cantidad mediante un proceso de fermentación. Varios procedimientos de fermentación por lotes alimentados a gran escala están disponibles para la producción de proteínas recombinantes. Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los anticuerpos de la presente descripción, pueden modificarse diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo, se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el plegamiento y solubilidad adecuados de proteínas heterólogas producidas en células huésped bacterianas. Chen *et al.* *J Bio Chem* 274: 19601-19605 (1999); las patentes de los EE. UU. núm. 6.083.715; las patentes de los EE. UU. núm. 6.027.888; Bothmann and Pluckthun, *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105 (2000); Ramm and Pluckthun, *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113 (2000); Arie *et al.*, *Mol. Microbiol.* 39:199-210 (2001).

Para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas expresadas (especialmente las que son sensibles proteolíticamente), pueden usarse determinadas cepas huésped deficientes para enzimas proteolíticas para la presente invención, como se describe en, por ejemplo, la patente de los EE. UU. núm. 5.264.365; las patentes de los EE. UU. núm. 5.508.192; Hara *et al.*, *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996). Las cepas *E. coli* deficientes para enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que

sobreexpresan una o más proteínas chaperonas pueden usarse como células huésped en el sistema de expresión que codifica los anticuerpos de la presente solicitud.

Los anticuerpos producidos en la presente descripción pueden purificarse adicionalmente para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas para
5 ensayos y usos adicionales. Pueden emplearse métodos de purificación de proteínas estándar conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE,
10 cromatoforofoque, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75. La proteína A inmovilizada en una fase sólida, por ejemplo, puede usarse en algunas modalidades para la purificación por inmunoafinidad de moléculas de unión de la presente descripción. La fase sólida a la que se inmoviliza la proteína A es preferiblemente una columna que comprende una
15 superficie de vidrio o sílice, más preferiblemente una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas modalidades, la columna se ha revestido con un reactivo, tal como glicerol, en un intento de evitar la adherencia no específica de contaminantes. Después, la fase sólida se lava para eliminar contaminantes que no se unen específicamente a la fase sólida. Finalmente, los
20 anticuerpos de interés se recuperan de la fase sólida mediante elución.

Producción recombinante en células eucariotas

Para la expresión en eucariotas, los componentes del vector generalmente incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes, una secuencia señal, un

origen de replicación, uno o más genes marcadores y un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

Un vector para su uso en un huésped eucariota también puede ser un inserto que codifica una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de
5 escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferiblemente es una que se reconoce y procesa (*es decir*, escindido por una peptidasa señal) por la célula huésped. En la expresión de células de mamífero, están disponibles secuencias señales de mamíferos, así como líderes de secreción viral, por ejemplo, la señal gD del herpes simple. El ADN para
10 dicha región precursora puede ligarse en marco de lectura al ADN que codifica los anticuerpos de la presente solicitud.

Generalmente, el componente de origen de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamíferos (el origen de SV40 se puede usar típicamente solo porque contiene el promotor temprano).

15 Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección pueden codificar proteínas que confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, *p. ej.*, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina; complementar las deficiencias auxotróficas; o suministrar nutrientes críticos no disponibles a partir de medios complejos.

20 Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Esas células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármacos y, por lo

tanto, sobreviven al régimen de selección. Ejemplos de tal selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son aquellos que permiten la identificación de células competentes para absorber ácido nucleico que codifica los anticuerpos de la presente solicitud. Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección de DHFR se identifican primero cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped apropiada ilustrativa cuando se emplea DHFR de tipo silvestre es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en la actividad de DHFR. Alternativamente, las células huésped (particularmente huéspedes de tipo silvestre que contienen DHFR endógeno) transformadas o cotransformadas con las secuencias de ADN codificante de polipéptido, la proteína DHFR de tipo silvestre, y otro marcador seleccionable tal como aminoglucósidos 3'-fosfotransferasa (APH, por sus siglas en inglés) se pueden seleccionar por crecimiento celular en un medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglucosídico.

Los vectores de expresión y clonación contienen normalmente un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está unido operativamente al ácido nucleico que codifica las secuencias polipeptídicas deseadas. Los genes eucariotas tienen una región rica en AT ubicada aproximadamente de 25 a 30 basándose en aguas arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Se puede incluir otra secuencia encontrada de 70 a 80 aguas arriba del inicio de la transcripción de muchos genes. El extremo 3' de la más eucariota puede ser la señal para la adición de la cola poli A al

extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias pueden insertarse en vectores de expresión eucariotas.

La transcripción polipeptídica de los vectores en células huésped de mamíferos puede controlarse, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus del polio, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus de simio 40 (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, *p. ej.*, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, a partir de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

La transcripción de un ADN que codifica los anticuerpos de la presente descripción por eucariotas superiores a menudo aumenta insertando una secuencia potenciadora en el vector. Muchas secuencias potenciadoras se conocen ahora de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polio en el lado tardío del origen de replicación y los potenciadores de adenovirus. *Ver también* Yaniv, *Nature* 297: 17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador se puede empalmar en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a la secuencia codificante del polipéptido, pero se ubica preferentemente en un sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas (células de levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanos o nucleadas de otros

organismos multicelulares) también contienen secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están comúnmente disponibles en las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADN o ADNc eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de

5 nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica el polipéptido. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina.

Las células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en la presente descripción incluyen células eucariotas superiores descritas en la presente
 10 descripción, incluyendo células huésped de vertebrados. La propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos útiles son la línea CV1 del riñón de mono transformado por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 o células subclonadas 293 para el crecimiento en cultivo en suspensión,
 15 Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario del hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); células sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde Africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA,
 20 ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562,

ATCC CCL51); células TR1 (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5; Células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios de
5 nutrientes convencionales modificados según corresponda para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Las células huésped usadas para producir los anticuerpos de esta solicitud pueden cultivarse en una variedad de medios. Los medios disponibles comercialmente, tales como el Ham's F10 (Sigma), medio esencial mínimo (MEM),
10 (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado de Dulbecco's ((DMEM), Sigma), son adecuados para cultivar las células huésped. Además, puede usarse cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), patente de los EE. UU. núm. 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; WO 90/03430; WO 87/00195; o la
15 patente de los Re. 30.985 como medios de cultivo para las células huésped.

Cualquier de estos medios puede ser complementado como necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tal como cloruro sódico, calcio, magnesio, y fosfato), reguladores (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina),
20 antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos usualmente presente concentraciones finales en el rango micromolar), y glucosa o un equivalente fuente de energía. Puede incluirse, también, cualquier otro suplemento necesario en concentraciones adecuadas que

serían conocidos por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y lo similar, son aquellas usadas anteriormente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para los expertos.

Cuando se usan técnicas recombinantes, los anticuerpos pueden producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, los residuos en partículas, las células huésped o los fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión generalmente se concentran primero usando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición proteica preparada a partir de las células se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad. En alguna modalidad, la composición proteica preparada a partir de las células puede purificarse usando un sistema de cromatografía AKTA. La matriz a la que se une el ligando de afinidad suele ser agarosa, pero hay otras matrices disponibles. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli (estireno-divinil) benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase reversa, cromatografía en sílice, cromatografía en

heparina SEPHAROSE™ cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatofoco, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar. Después de cualquier etapa o etapas de purificación preliminares, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba de pH bajo.

5.5. Composiciones farmacéuticas

En un aspecto, la presente descripción proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de la presente descripción. En algunas modalidades, una composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se preparan para el almacenamiento mediante la mezcla de la proteína de fusión que tiene el grado de pureza deseado con excipientes opcionales fisiológicamente aceptables (*ver, p. ej.*, Remington, Remington's Pharmaceutical Sciences (décimo octava edición, 1980)) en la forma de soluciones acuosas o liofilizada u otras formas secas.

El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de la presente descripción puede formularse en cualquier forma adecuada para suministrarse a una célula/tejido diana, p. ej., como microcápsulas o macroemulsiones (Remington, *supra*; Park *et al.*, 2005, *Molecules* 10:146-61; Malik *et al.*, 2007, *Curr. Fármaco Deliv.* 4:141-

51), como formulaciones de liberación sostenida (Putney y Burke, 1998, Nature Biotechnol. 16:153-57), o en liposomas (Maclean *et al.*, 1997, Int. J. Oncol 11:325-32; Kontermann, 2006, Curr. Opin. Mol. Ther. 8:39-45).

Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción también puede encerrarse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsula de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen, por ejemplo, en Remington, *supra*.

Se conocen varias composiciones y sistemas de suministro, y pueden usarse con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este como se describe en la presente descripción, que incluye, pero no se limita a, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este, endocitosis mediada por receptor (*ver, p. ej.*, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-32), construcción de un ácido nucleico como parte de un retroviral u otro vector, etc. En otra modalidad, puede proporcionarse una composición como un sistema de liberación controlada o de liberación sostenida. En una modalidad, puede usarse una bomba para lograr la liberación sostenida o controlada (*ver, p. ej.*, Langer, *supra*; Sefton, 1987, Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201-40; Buchwald *et al.*, 1980, Surgery 88:507-16; y Saudek *et al.*, 1989, N. Engl. J. Med. 321:569-74). En otra modalidad, pueden usarse materiales poliméricos para lograr una liberación controlada o

sostenida de un agente profiláctico o terapéutico (*p. ej.*, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este como se describe en la presente descripción) o una composición proporcionada en la presente descripción (*ver, p. ej.*, Medical Applications of Controlled Release (Langer and Wise, eds., 1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance (Smolen and Ball eds., 1984); Ranger y Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61-126; Levy *et al.*, 1985, Science 228:190-92; During *et al.*, 1989, Ann. Neurol. 25:351-56; Howard *et al.*, 1989, J. Neurosurg. 71:105-12; las patentes de los EE. UU. núms. 5.679.377; 5.916.597; 5.912.015; 5.989.463; y 5.128.326; publicación PCT WO 99/15154 y WO 99/20253). Los ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli (2-hidroxietil metacrilato), poli(metilmetacrilato), poli(ácido acrílico), poli (etileno-co-acetato de vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), poliacrilamida, poli(etilenglicol), poliláctidos (PLA), poli(lactida-co-glicólidos) (PLGA) y poliortoésteres. En una modalidad, el polímero usado en una formulación de liberación sostenida es inerte, libre de impurezas lixiviables, estable en almacenamiento, estéril y biodegradable.

En aún otra modalidad, un sistema de liberación controlada o sostenida puede colocarse en las proximidades de un tejido diana particular, por ejemplo, las fosas nasales o pulmones; por lo tanto, se requiere solo una fracción de la dosis sistémica (*ver, p. ej.*, Goodson, Medical Applications of Controlled Release Vol. 2, 115-38 (1984)). Los sistemas de liberación controlada se describen, por ejemplo, en Langer, 1990, Science 249:1527-33. Cualquier técnica conocida por un experto en la técnica puede usarse para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno

o más anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de este proporcionados en la presente descripción (*ver, p. ej.*, patente de los EE. UU. núm. 4.526.938, publicación PCT núm. WO 91/05548 y WO 96/20698, Ning *et al.*, 1996, Radiotherapy & Oncology 39:179-89; Song *et al.*, 1995, PDA J. of Pharma. Sci. & Tech. 50:372-97; Cleek *et al.*, 5 1997, Pro. Int'l. Symp. Control: Int. Bioact. Mater. 24:853-54; y Lam *et al.*, 1997, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-60).

5.6 Métodos para usar los anticuerpos

En un aspecto, en la presente descripción se proporciona un método para atenuar una actividad de IL-1 β en una célula, que comprende exponer la célula a una 10 cantidad efectiva de un anticuerpo proporcionado en la presente descripción.

En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción inhibe la vía de señalización de IL-1 β . En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción inhibe la bioactividad de IL-1 β . En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción inhibe la 15 producción de IL-6. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción inhibe la producción de CXCL5. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción inhibe la producción de G-CSF. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción inhibe la producción de IL-6, CXCL5 y G-CSF. En algunas modalidades, el anticuerpo 20 proporcionado en la presente descripción inhibe la bioactividad de IL-1 β en fibroblastos humanos. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción inhibe la producción de IL-6, CXCL5 y G-CSF en fibroblastos humanos. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción inhibe la

bioactividad de IL-1 β en fibroblastos humanos. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción inhibe la bioactividad de IL-1 β en muestras de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC, por sus siglas en inglés). En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción inhibe la bioactividad de IL-1 β en muestras de sangre entera humana.

En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción reacciona de forma cruzada con IL-1 β de cynomolgus. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción inhibe la bioactividad de IL-1 β en fibroblastos de mono cynomolgus.

En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa una actividad de IL-1 β en al menos aproximadamente 10 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa una actividad de IL-1 β en al menos aproximadamente 20 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa una actividad de IL-1 β en al menos aproximadamente 30 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa una actividad de IL-1 β en al menos aproximadamente 40 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa una actividad de IL-1 β en al menos aproximadamente 50 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa una actividad de IL-1 β en al menos aproximadamente 60 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa una actividad de IL-1 β en al menos aproximadamente 70 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa una actividad de IL-1 β en al menos aproximadamente 80 %.

En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa una actividad de IL-1 β en al menos aproximadamente 90 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa una actividad de IL-1 β en al menos aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa una actividad de IL-1 β en al menos aproximadamente 98 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa una actividad de IL-1 β en al menos aproximadamente 100 %. En ciertas modalidades, el anticuerpo descrito en la presente descripción puede atenuar (*p. ej.*, atenuar parcialmente) una actividad de IL-1 β en al menos aproximadamente 15 % a aproximadamente 65 %. En ciertas modalidades, el anticuerpo descrito en la presente descripción puede atenuar (*p. ej.*, atenuar parcialmente) una actividad de IL-1 β en al menos aproximadamente 20 % a aproximadamente 65 %. En ciertas modalidades, el anticuerpo descrito en la presente descripción puede atenuar (*p. ej.*, atenuar parcialmente) una actividad de IL-1 β en al menos aproximadamente 30 % a aproximadamente 65 %.

Un ejemplo no limitante de una actividad de IL-1 β es la señalización mediada por IL-1 β . Por lo tanto, en ciertas modalidades, en la presente descripción se proporciona un método para atenuar (*p. ej.*, atenuar parcialmente) la señalización mediada por 1 β en una célula, que comprende exponer a la célula a una cantidad efectiva de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción.

En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la señalización mediada por IL-1 β en al menos aproximadamente 10 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la señalización mediada por IL-1 β en al menos aproximadamente

20 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la señalización mediada por IL-1 β en al menos aproximadamente 30 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la señalización mediada por IL-1 β en al menos aproximadamente 40 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la señalización mediada por IL-1 β en al menos aproximadamente 50 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la señalización mediada por IL-1 β en al menos aproximadamente 60 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la señalización mediada por IL-1 β en al menos aproximadamente 70 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la señalización mediada por IL-1 β en al menos aproximadamente 80 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la señalización mediada por IL-1 β en al menos aproximadamente 90 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la señalización mediada por IL-1 β en al menos aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la señalización mediada por IL-1 β en al menos aproximadamente 98 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la señalización mediada por IL-1 β en aproximadamente 100 %. En ciertas modalidades, el anticuerpo descrito en la presente descripción puede atenuar (*p. ej.*, atenuar parcialmente) la señalización mediada por IL-1 β en al menos aproximadamente 15 % a aproximadamente 65 %. En ciertas modalidades, el

anticuerpo descrito en la presente descripción puede atenuar (*p. ej.*, atenuar parcialmente) la señalización mediada por IL-1 β en al menos aproximadamente 20 % a aproximadamente 65 %. En ciertas modalidades, el anticuerpo descrito en la presente descripción puede atenuar (*p. ej.*, atenuar parcialmente) la señalización mediada por IL-1 β en al menos aproximadamente 30 % a aproximadamente 65 %.

En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de IL-6 en al menos aproximadamente 10 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de IL-6 en al menos aproximadamente 20 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de IL-6 en al menos aproximadamente 30 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de IL-6 en al menos aproximadamente 40 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de IL-6 en al menos aproximadamente 50 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de IL-6 en al menos aproximadamente 60 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de IL-6 en al menos aproximadamente 70 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de IL-6 en al menos aproximadamente 80 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de IL-6 en al menos

aproximadamente 90 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de IL-6 en al menos aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de IL-6 en al menos

5 aproximadamente 98 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de IL-6 en al menos aproximadamente 100 %. En ciertas modalidades, el anticuerpo descrito en la presente descripción puede atenuar (*p. ej.*, atenuar parcialmente) la producción inducida por IL-1 β de IL-6 en al menos aproximadamente 15 % a aproximadamente

10 65 %. En ciertas modalidades, el anticuerpo descrito en la presente descripción puede atenuar (*p. ej.*, atenuar parcialmente) la producción inducida por IL-1 β de IL-6 en al menos aproximadamente 20 % a aproximadamente 65 %. En ciertas modalidades, el anticuerpo descrito en la presente descripción puede atenuar (*p. ej.*, atenuar parcialmente) la producción inducida por IL-1 β de IL-6 en al menos

15 aproximadamente 30 % a aproximadamente 65 %.

En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de CXCL5 en al menos aproximadamente 10 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de CXCL5 en al menos

20 aproximadamente 20 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de CXCL5 en al menos aproximadamente 30 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de CXCL5 en al menos

aproximadamente 40 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de CXCL5 en al menos aproximadamente 50 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de CXCL5 en al menos

5 aproximadamente 60 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de CXCL5 en al menos aproximadamente 70 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de CXCL5 en al menos

10 aproximadamente 80 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de CXCL5 en al menos aproximadamente 90 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de CXCL5 en al menos

15 aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de CXCL5 en al menos aproximadamente 98 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de CXCL5 en al menos

20 aproximadamente 100 %. En ciertas modalidades, el anticuerpo descrito en la presente descripción puede atenuar (*p. ej.*, atenuar parcialmente) la producción inducida por IL-1 β de CXCL5 en al menos aproximadamente 15 % a aproximadamente 65 %. En ciertas modalidades, el anticuerpo descrito en la presente descripción puede atenuar (*p. ej.*, atenuar parcialmente) la producción inducida por IL-1 β de CXCL5 en al menos aproximadamente 20 % a aproximadamente 65 %. En ciertas modalidades, el anticuerpo descrito en la presente descripción puede atenuar (*p. ej.*, atenuar

parcialmente) la producción inducida por IL-1 β de CXCL5 en al menos aproximadamente 30 % a aproximadamente 65 %.

En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de G-CSF en al menos

- 5 aproximadamente 10 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de G-CSF en al menos aproximadamente 20 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de G-CSF en al menos
- 10 aproximadamente 30 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de G-CSF en al menos aproximadamente 40 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de G-CSF en al menos
- 15 aproximadamente 50 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de G-CSF en al menos aproximadamente 60 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de G-CSF en al menos
- 20 aproximadamente 70 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de G-CSF en al menos aproximadamente 80 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de G-CSF en al menos
- aproximadamente 90 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de G-CSF en al menos aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la

presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de G-CSF en al menos aproximadamente 98 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la producción inducida por IL-1 β de G-CSF en aproximadamente 100 %. En ciertas modalidades, el anticuerpo descrito en la presente descripción puede atenuar (*p. ej.*, atenuar parcialmente) la producción inducida por IL-1 β de G-CSF en al menos aproximadamente 15 % a aproximadamente 65 %. En ciertas modalidades, el anticuerpo descrito en la presente descripción puede atenuar (*p. ej.*, atenuar parcialmente) la producción inducida por IL-1 β de G-CSF en al menos aproximadamente 20 % a aproximadamente 65 %. En ciertas modalidades, el anticuerpo descrito en la presente descripción puede atenuar (*p. ej.*, atenuar parcialmente) la producción inducida por IL-1 β de G-CSF en al menos aproximadamente 30 % a aproximadamente 65 %.

En algunas modalidades, los anticuerpos proporcionados en la presente descripción atenúan la unión a IL-1 β a al menos uno de sus receptores.

Otro ejemplo no limitante de una actividad de IL-1 β es la unión a IL-1R1. Por lo tanto, en ciertas modalidades, en la presente descripción se proporciona un método para atenuar (*p. ej.*, atenuar parcialmente) la unión de IL-1 β a IL-1R1, que comprende exponer una célula a una cantidad efectiva de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción.

En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la unión de IL-1 β a IL-1R1 en al menos aproximadamente 10 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la unión de IL-1 β a IL-1R1 en al menos aproximadamente 20 %. En algunas modalidades,

el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la unión de IL-1 β a IL-1R1 en al menos aproximadamente 30 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la unión de IL-1 β a IL-1R1 en al menos aproximadamente 40 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la unión de IL-1 β a IL-1R1 en al menos aproximadamente 50 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la unión de IL-1 β a IL-1R1 en al menos aproximadamente 60 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la unión de IL-1 β a IL-1R1 en al menos aproximadamente 70 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la unión de IL-1 β a IL-1R1 en al menos aproximadamente 80 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la unión de IL-1 β a IL-1R1 en al menos aproximadamente 90 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la unión de IL-1 β a IL-1R1 en al menos aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la unión de IL-1 β a IL-1R1 en al menos aproximadamente 98 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la unión de IL-1 β a IL-1R1 en aproximadamente 100 %. En ciertas modalidades, el anticuerpo descrito en la presente descripción puede atenuar (*p. ej.*, atenuar parcialmente) la unión de IL-1 β a IL-1R1 en al menos aproximadamente 15 % a aproximadamente 65 %. En ciertas modalidades, el anticuerpo descrito en la presente descripción puede atenuar (*p. ej.*, atenuar parcialmente) la unión de IL-1 β a IL-1R1 en al menos aproximadamente 20 % a aproximadamente 65 %. En ciertas modalidades, el anticuerpo descrito en la

presente descripción puede atenuar (*p. ej.*, atenuar parcialmente) la unión de IL-1 β a IL-1R1 en al menos aproximadamente 30 % a aproximadamente 65 %.

Otro ejemplo no limitante de una actividad de IL-1 β es la señalización mediada por IL-1R1. Por lo tanto, en ciertas modalidades, en la presente descripción se proporciona un método para atenuar (*p. ej.*, atenuar parcialmente) la señalización mediada por IL-1R1 en una célula, que comprende exponer a la célula a una cantidad efectiva de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción.

En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la señalización mediada por IL-1R1 en al menos

aproximadamente 10 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la señalización mediada por IL-1R1 en al menos

aproximadamente 20 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la señalización mediada por IL-1R1 en al menos

aproximadamente 30 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la señalización mediada por IL-1R1 en al menos

aproximadamente 40 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la señalización mediada por IL-1R1 en al menos

aproximadamente 50 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la señalización mediada por IL-1R1 en al menos

aproximadamente 60 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la señalización mediada por IL-1R1 en al menos

aproximadamente 70 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la señalización mediada por IL-1R1 en al menos

aproximadamente 80 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la señalización mediada por IL-1R1 en al menos aproximadamente 90 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la señalización mediada por IL-1R1 en al menos

5 aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la señalización mediada por IL-1R1 en al menos aproximadamente 98 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción atenúa la señalización mediada por IL-1R1 en aproximadamente 100 %. En ciertas modalidades, el anticuerpo descrito en la presente descripción

10 puede atenuar (*p. ej.*, atenuar parcialmente) la señalización mediada por IL-1R1 en al menos aproximadamente 15 % a aproximadamente 65 %. En ciertas modalidades, el anticuerpo descrito en la presente descripción puede atenuar (*p. ej.*, atenuar parcialmente) la señalización mediada por IL-1R1 en al menos aproximadamente 20 % a aproximadamente 65 %. En ciertas modalidades, el anticuerpo descrito en la

15 presente descripción puede atenuar (*p. ej.*, atenuar parcialmente) la señalización mediada por IL-1R1 en al menos aproximadamente 30 % a aproximadamente 65 %.

En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción inhibe el inicio y la progresión de la vía de señalización de IL-1 en al menos aproximadamente 10 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la

20 presente descripción inhibe el inicio y la progresión de la vía de señalización de IL-1 en al menos aproximadamente 20 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción inhibe el inicio y la progresión de la vía de señalización de IL-1 en al menos aproximadamente 30 %. En algunas modalidades, el anticuerpo

proporcionado en la presente descripción inhibe el inicio y la progresión de la vía de señalización de IL-1 en al menos aproximadamente 40 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción inhibe el inicio y la progresión de la vía de señalización de IL-1 en al menos aproximadamente 50 %. En algunas

5 modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción inhibe el inicio y la progresión de la vía de señalización de IL-1 en al menos aproximadamente 60 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción inhibe el inicio y la progresión de la vía de señalización de IL-1 en al menos aproximadamente 70 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción

10 inhibe el inicio y la progresión de la vía de señalización de IL-1 en al menos aproximadamente 80 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción inhibe el inicio y la progresión de la vía de señalización de IL-1 en al menos aproximadamente 90 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción inhibe el inicio y la progresión de la vía de señalización de IL-1

15 en al menos aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción inhibe el inicio y la progresión de la vía de señalización de IL-1 en al menos aproximadamente 98 %. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente descripción inhibe el inicio y la progresión de la vía de señalización de IL-1 en aproximadamente 100 %. En ciertas modalidades, el

20 anticuerpo descrito en la presente descripción puede atenuar (p. ej., atenuar parcialmente) el inicio y la progresión de la vía de señalización de IL-1 en al menos aproximadamente 15 % a aproximadamente 65 %. En ciertas modalidades, el anticuerpo descrito en la presente descripción puede atenuar (p. ej., atenuar parcialmente) el inicio y

la progresión de la vía de señalización de IL-1 en al menos aproximadamente 20 % a aproximadamente 65 %. En ciertas modalidades, el anticuerpo descrito en la presente descripción puede atenuar (p. ej., atenuar parcialmente) el inicio y la progresión de la vía de señalización de IL-1 en al menos aproximadamente 30 % a aproximadamente 65 %.

5 En otro aspecto, en la presente descripción se proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción. En una modalidad, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno mediado por IL-1 β . En una modalidad, la enfermedad o trastorno
10 es una enfermedad o trastorno mediado por IL-1R1. En la presente descripción también se proporciona un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno, en donde al sujeto se le administra uno o más agentes terapéuticos en combinación con el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción.

La descripción también se refiere a métodos para usar los anticuerpos
15 proporcionados en la presente descripción para inhibir, es decir, antagonizar, la función de IL-1 β para inhibir la activación de la vía de señalización de IL-1 y, por lo tanto, regular la inflamación, dando como resultado el tratamiento de un trastorno patológico, tal como el cáncer. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer de pulmón. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer de células renales.

20 En algunas modalidades, en la presente descripción se proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno mediado por IL-1 β en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo IL-1 β aislado o fragmento de unión al antígeno de este como se describe en la

presente descripción. En algunas modalidades, en la presente descripción se proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno inflamatorio en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo IL-1 β aislado o fragmento de unión al antígeno de este como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno mediado por IL-1 β es cáncer, tal como cáncer de pulmón o cáncer de riñón.

En algunas modalidades, en la presente descripción se proporciona un método para tratar cáncer de pulmón en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo IL-1 β aislado o fragmento de unión al antígeno de este como se describe en la presente descripción. La administración puede comprender, por ejemplo, administración sistémica o local.

En algunas modalidades, el sujeto ha sido diagnosticado con cáncer de pulmón (p. ej., cáncer de pulmón de células no pequeñas). En algunas modalidades, el sujeto ha sido diagnosticado con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) en etapa 0. En algunas modalidades, el sujeto ha sido diagnosticado con NSCLC en etapa 1. En algunas modalidades, el sujeto ha sido diagnosticado con NSCLC en etapa 2. En algunas modalidades, el sujeto ha sido diagnosticado con NSCLC en etapa 2 y se ha sometido a cirugía. En algunas modalidades, el sujeto ha sido diagnosticado con NSCLC en etapa 3. En algunas modalidades, el sujeto ha sido diagnosticado con NSCLC en etapa 3 y se sometió a cirugía. En algunas modalidades, el sujeto ha sido diagnosticado con NSCLC en etapa 4.

En algunas modalidades, en la presente descripción se proporciona un método para tratar cáncer de riñón en un sujeto, que comprende administrar al sujeto

una cantidad efectiva de un anticuerpo IL-1 β aislado o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción.

En algunas modalidades, el sujeto ha sido diagnosticado con cáncer de riñón, p. ej., carcinoma de células renales (RCC, por sus siglas en inglés). En algunas modalidades, el sujeto ha sido diagnosticado en etapa 1. En algunas modalidades, el sujeto ha sido diagnosticado con RCC en etapa 2. En algunas modalidades, el sujeto ha sido diagnosticado con RCC en etapa 3.

En algunas modalidades, los anticuerpos proporcionados en la presente descripción se usan para la intercepción del cáncer de pulmón. En algunas modalidades, se ha identificado que el sujeto está en riesgo de desarrollar cáncer de pulmón. En algunas modalidades, en la presente descripción se proporciona un método para reducir el riesgo de cáncer de pulmón en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo IL-1 β aislado o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción.

Un sujeto en riesgo de desarrollar cáncer de pulmón puede identificarse mediante diversos factores conocidos en la técnica. En algunas modalidades, se ha determinado que el sujeto tiene uno o más nódulos pulmonares, tales como nódulos pulmonares precancerosos (p. ej., identificados por imágenes tomográficas computarizadas). En algunas modalidades, el uno o más nódulos de pulmón son precancerosos. En algunas modalidades, el sujeto está entre las edades de aproximadamente 50 años a aproximadamente 80 años de edad y/o el sujeto tiene antecedentes de tabaquismo, por ejemplo, un historial de tabaquismo de 20 paquetes

por año. En algunas modalidades, el sujeto tiene un nivel elevado de proteína C reactiva (CRP, por sus siglas en inglés).

De acuerdo con una modalidad adicional, un sujeto en riesgo de desarrollar cáncer de pulmón se identifica de acuerdo a métodos descritos en WO2021/146516

5 (“SYSTEM AND METHOD FOR PREDICTING THE RISK OF FUTURE LUNG CANCER”), que se incorpora por referencia en la presente descripción, y al sujeto en riesgo se le administra una cantidad efectiva de un anticuerpo de IL-1 β aislado o un fragmento de unión al antígeno de este como se describe en la presente descripción. Por ejemplo, un método puede comprender identificar a un paciente en riesgo de

10 desarrollar cáncer de pulmón obteniendo una o más imágenes capturadas del paciente (p. ej., tomografías computarizadas); extraer características de la una o más imágenes obtenidas (p. ej., las características extraídas comprenden al menos características específicas del no nódulo, en donde las características específicas del no nódulo comprenden una o ambas características del parénquima pulmonar o características de

15 composición corporal); predecir uno o más riesgos futuros de cáncer de pulmón para el sujeto aplicando uno o más modelos de predicción de riesgo entrenados para analizar las características extraídas de la una o más imágenes obtenidas; y, si el paciente se identifica en riesgo de desarrollar cáncer de pulmón (p. ej., en riesgo de desarrollar

20 cáncer de pulmón en 1 año, 3 años, 5 años o 10 años), administrar al paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo de IL-1 β aislado o fragmento de unión al antígeno de este como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, los anticuerpos proporcionados en la presente descripción se usan para la prevención del cáncer de pulmón. La prevención puede ser

completa, p. ej., la ausencia total de una condición o trastorno relacionado con IL-1 β . La prevención también puede ser parcial, de manera que la probabilidad de la aparición de la condición relacionada con IL-1 β o trastorno metabólico en un sujeto es menos probable que ocurra que si el sujeto no hubiera recibido un anticuerpo de la presente descripción.

5 Los métodos de administración y dosificación se describen con mayor detalle en la Sección 5.7 más abajo.

 En otro aspecto, en la presente descripción se proporciona el uso del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o
10 trastorno en un sujeto.

 En otro aspecto, en la presente descripción se proporciona el uso de una composición farmacéutica proporcionada en la presente descripción en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto.

 En otro aspecto, en la presente descripción se proporciona el uso de un
15 anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción en la fabricación de un medicamento, en donde el medicamento es para su uso en un método para detectar la presencia de una IL-1 β en una muestra biológica, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con el anticuerpo en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo a la proteína IL-1 β ,
20 y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo y la proteína IL-1 β .

 En otros aspectos, los anticuerpos y fragmentos de los estos de la presente descripción son útiles para detectar la presencia de una IL-1 β en una muestra biológica. El término “detectar” como se usa en la presente descripción abarca la

detección cuantitativa o cualitativa. En ciertas modalidades, una muestra biológica comprende fluido corporal, una célula o un tejido. Los ensayos y métodos de diagnóstico se describen con mayor detalle en la Sección 5.9 más abajo.

5.7 Métodos de administración y dosificación

5 En una modalidad específica, en la presente descripción se proporciona una composición para usar en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o condición que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción. En una modalidad, en la presente descripción se proporciona una composición para usar en la prevención de una enfermedad o condición, en donde la

10 composición comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción. En una modalidad, en la presente descripción se proporciona una composición para usar en el tratamiento de una enfermedad o condición, en donde la composición comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción. En algunas modalidades, la

15 enfermedad o condición es una enfermedad mediada por IL-1 β . En algunas modalidades, la enfermedad o condición es una enfermedad mediada por IL-1R1. En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno está asociado con IL-1 β . En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno está asociado con IL-1 β . En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno inflamatorio. En

20 algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es cáncer. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer de pulmón. En algunas modalidades, el cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón de células no pequeñas. En algunas modalidades, el cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón de células no pequeñas en etapa 0. En algunas

modalidades, el cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón de células no pequeñas en etapa 1. En algunas modalidades, el cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón de células no pequeñas en etapa 2. En algunas modalidades, el cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón de células no pequeñas en etapa 3. En algunas modalidades, el
5 cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón de células no pequeñas en etapa 4. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer de riñón. En algunas modalidades, el cáncer de riñón es un cáncer de células renales. En algunas modalidades, el cáncer de células renales es cáncer de células renales de etapa 1. En algunas modalidades, el cáncer de células renales es cáncer de células renales de etapa 2. En algunas
10 modalidades, el cáncer de células renales es cáncer de células renales de etapa 3. En algunas modalidades, el sujeto es un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, el sujeto tiene la enfermedad o afección. En otras modalidades, el sujeto corre el riesgo de padecer la enfermedad o afección. En algunas modalidades, la administración resulta en la prevención, manejo, tratamiento o mejora de la enfermedad o condición.

15 En una modalidad, en la presente descripción se proporciona una composición para usar en la prevención y/o tratamiento de un síntoma de una enfermedad o condición, en donde la composición comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción. En una modalidad, en la presente descripción se proporciona una composición para usar
20 en la prevención de un síntoma de una enfermedad o condición, en donde la composición comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción. En una modalidad, en la presente descripción se proporciona una composición para usar en el tratamiento de un síntoma

de una enfermedad o condición, en donde la composición comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente descripción. En algunas modalidades, la enfermedad o condición es una enfermedad mediada por IL-1 β . En algunas modalidades, la enfermedad o condición es una enfermedad mediada por IL-1R1. En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno está asociado con IL-1 β . En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno está asociado con IL-1 β . En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno inflamatorio. En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es cáncer. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer de pulmón. En algunas modalidades, el cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón de células no pequeñas. En algunas modalidades, el cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón de células no pequeñas en etapa 0. En algunas modalidades, el cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón de células no pequeñas en etapa 1. En algunas modalidades, el cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón de células no pequeñas en etapa 2. En algunas modalidades, el cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón de células no pequeñas en etapa 3. En algunas modalidades, el cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón de células no pequeñas en etapa 4. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer de riñón. En algunas modalidades, el cáncer de riñón es un cáncer de células renales. En algunas modalidades, el cáncer de células renales es cáncer de células renales de etapa 1. En algunas modalidades, el cáncer de células renales es cáncer de células renales de etapa 2. En algunas modalidades, el cáncer de células renales es cáncer de células renales de etapa 3. En ciertas modalidades, el sujeto es un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, el sujeto tiene la enfermedad o afección. En otras modalidades, el sujeto corre el riesgo

de padecer la enfermedad o afección. En algunas modalidades, la administración da como resultado la prevención o el tratamiento del síntoma de la enfermedad o afección.

En otra modalidad, en la presente descripción se proporciona un método para prevenir y/o tratar una enfermedad o condición en un sujeto, que comprende administrar

5 una cantidad efectiva de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción. En una modalidad, en la presente descripción se proporciona un método para prevenir una enfermedad o condición en un sujeto, que comprende administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción. En una modalidad, en la

10 presente descripción se proporciona un método para tratar una enfermedad o condición en un sujeto, que comprende administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción. En algunas modalidades, la enfermedad o condición es una enfermedad mediada por IL-1 β . En algunas modalidades, la enfermedad o condición es una enfermedad mediada por IL-

15 1R1. En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno está asociado con IL-1 β . En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno está asociado con IL-1 β . En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno inflamatorio. En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es cáncer. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer de pulmón. En algunas modalidades, el cáncer de pulmón es un

20 cáncer de pulmón de células no pequeñas. En algunas modalidades, el cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón de células no pequeñas en etapa 0. En algunas modalidades, el cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón de células no pequeñas en etapa 1. En algunas modalidades, el cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón de

células no pequeñas en etapa 2. En algunas modalidades, el cáncer de pulmón es un
cáncer de pulmón de células no pequeñas en etapa 3. En algunas modalidades, el
cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón de células no pequeñas en etapa 4. En
algunas modalidades, el cáncer es un cáncer de riñón. En algunas modalidades, el
5 cáncer de riñón es un cáncer de células renales. En algunas modalidades, el cáncer de
células renales es cáncer de células renales de etapa 1. En algunas modalidades, el
cáncer de células renales es cáncer de células renales de etapa 2. En algunas
modalidades, el cáncer de células renales es cáncer de células renales de etapa 3. En
ciertas modalidades, el sujeto es un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, el
10 sujeto tiene la enfermedad o afección. En otras modalidades, el sujeto corre el riesgo de
padecer la enfermedad o afección. En algunas modalidades, la administración da como
resultado en la prevención o tratamiento de la enfermedad o afección.

En otra modalidad, en la presente descripción se proporciona un método
para prevenir y/o tratar un síntoma de una enfermedad o condición en un sujeto, que
15 comprende administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo o fragmento de unión al
antígeno de este proporcionado en la presente descripción. En una modalidad, en la
presente descripción se proporciona un método para prevenir un síntoma de una
enfermedad o condición en un sujeto, que comprende administrar una cantidad efectiva
de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la
20 presente descripción. En una modalidad, en la presente descripción se proporciona un
método para tratar un síntoma de una enfermedad o condición en un sujeto, que
comprende administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo o fragmento de unión al
antígeno de este proporcionado en la presente descripción. En algunas modalidades, la

enfermedad o condición es una enfermedad mediada por IL-1 β . En algunas
 modalidades, la enfermedad o condición es una enfermedad mediada por IL-1R1. En
 algunas modalidades, la enfermedad o trastorno está asociado con IL-1 β . En algunas
 modalidades, la enfermedad o trastorno está asociado con IL-1 β . En algunas
 5 modalidades, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno inflamatorio. En
 algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es cáncer. En algunas modalidades, el
 cáncer es un cáncer de pulmón. En algunas modalidades, el cáncer de pulmón es un
 cáncer de pulmón de células no pequeñas. En algunas modalidades, el cáncer de
 pulmón es un cáncer de pulmón de células no pequeñas en etapa 0. En algunas
 10 modalidades, el cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón de células no pequeñas en
 etapa 1. En algunas modalidades, el cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón de
 células no pequeñas en etapa 2. En algunas modalidades, el cáncer de pulmón es un
 cáncer de pulmón de células no pequeñas en etapa 3. En algunas modalidades, el
 cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón de células no pequeñas en etapa 4. En
 15 algunas modalidades, el cáncer es un cáncer de riñón. En algunas modalidades, el
 cáncer de riñón es un cáncer de células renales. En algunas modalidades, el cáncer de
 células renales es cáncer de células renales de etapa 1. En algunas modalidades, el
 cáncer de células renales es cáncer de células renales de etapa 2. En algunas
 modalidades, el cáncer de células renales es cáncer de células renales de etapa 3. En
 20 ciertas modalidades, el sujeto es un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, el
 sujeto tiene la enfermedad o afección. En otras modalidades, el sujeto corre el riesgo
 de padecer la enfermedad o afección. En algunas modalidades, la administración da
 como resultado la prevención o el tratamiento del síntoma de la enfermedad o afección.

En la presente descripción también se proporcionan métodos para prevenir y/o tratar una enfermedad o condición al administrar a un sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción, o composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción. En un aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este está sustancialmente purificado (*es decir*, sustancialmente libre de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no deseados). El sujeto al que se administró una terapia puede ser un mamífero tal como no primate (*p. ej.*, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, *etc.*) o un primate (*p. ej.*, un mono, tal como un mono macaco, o un ser humano). En una modalidad, el sujeto es un ser humano. En otra modalidad, el sujeto es un ser humano con una enfermedad o afección.

Se conocen varios sistemas de administración y se pueden usar para administrar un agente profiláctico o terapéutico (*p. ej.*, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción). Los métodos para administrar un agente profiláctico o terapéutico (*p. ej.*, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción), o composición farmacéutica incluyen, pero no se limitan a, la administración parenteral (*p. ej.*, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural y mucosa (*p. ej.*, vía intranasal y oral). En una modalidad específica, un agente profiláctico o terapéutico (*p. ej.*, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción), o una composición farmacéutica se administra por vía intranasal, intramuscular, intravenosa o subcutánea.

En una modalidad específica, puede ser deseable administrar un agente profiláctico o terapéutico, o una composición farmacéutica proporcionada en la presente descripción localmente en el área que necesita tratamiento. Esto puede lograrse, por ejemplo, y sin limitación, mediante infusión local, mediante administración tópica (*p. ej.*,
5 por pulverización intranasal), mediante inyección, o por medio de un implante.

En una modalidad específica, una composición proporcionada en la presente descripción comprende uno, dos o más anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de este proporcionados en la presente descripción. En otra modalidad, en la presente descripción se proporciona una composición que comprende uno, dos o más
10 anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos proporcionados en la presente descripción y un agente profiláctico o terapéutico distinto de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción. En una modalidad, se conoce que los agentes son útiles o se han usado actualmente para la prevención, manejo, tratamiento y/o mejora de una enfermedad o afección. Además de
15 los agentes profilácticos o terapéuticos, las composiciones proporcionadas en la presente descripción también pueden comprender uno o más excipientes.

Las composiciones proporcionadas en la presente descripción incluyen composiciones farmacéuticas a granel útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (*p. ej.*, composiciones que son adecuadas para la administración a un
20 sujeto o paciente) que pueden usarse en la preparación de formas de dosificación unitaria. En una modalidad, una composición proporcionada en la presente descripción es una composición farmacéutica. Tales composiciones comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de uno o más agentes profilácticos o

terapéuticos (*p. ej.*, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción u otro agente profiláctico o terapéutico), y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para ser adecuadas para la vía de administración a un sujeto.

5 En una modalidad específica, el término “excipiente” también puede referirse a un diluyente, adyuvante (*p. ej.*, el adyuvante de Freund (completo o incompleto) o vehículo. Los excipientes farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como el agua y aceites, incluidos los de origen petrolero, animal, vegetal o sintético. El agua es un excipiente ilustrativo cuando la composición farmacéutica se
10 administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y la dextrosa acuosa y soluciones de glicerol también pueden usarse como excipientes líquidos, particularmente para soluciones inyectables. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes reguladores de pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de
15 soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y lo similar. Ejemplos no limitativos de excipientes farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA. Tales composiciones contendrán una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva del anticuerpo o fragmento de
20 unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción, como en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de excipiente(s) para proporcionar la forma para la administración adecuada al paciente. La formulación debe adaptarse al modo de administración.

En una modalidad, la composición se formula de acuerdo con procedimientos como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos.

Generalmente, los ingredientes de las composiciones proporcionadas en la presente descripción pueden suministrarse ya sea por separado o mezclados juntos en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente, tal como una ampolla o un sobre que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se administra por infusión, puede dispensarse con un frasco de infusión que contiene agua de grado farmacéutico estéril o solución salina. Cuando la composición se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina, de manera que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción puede envasarse en un recipiente cerrado herméticamente, tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad de anticuerpo. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se suministra como un polvo liofilizado seco esterilizado o concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente y puede reconstituirse, *p. ej.*, con agua o solución salina a la concentración adecuada para la administración a un sujeto.

Las composiciones proporcionadas en la presente descripción pueden formularse como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones y las formadas con cationes.

La cantidad de un agente profiláctico o terapéutico (*p. ej.*, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente descripción), o una composición proporcionada en la presente descripción que será efectiva en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o condición puede determinarse mediante técnicas clínicas conocidas en la técnica. La dosis precisa a usar en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de una enfermedad o afección, y debe decidirse de acuerdo con el juicio del médico y las circunstancias de cada paciente.

En ciertas modalidades, la vía de administración de una dosis de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción a un paciente es intranasal, intramuscular, intravenosa, subcutánea o una combinación de estas, pero también son aceptables otras vías descritas en la presente descripción. Cada dosis puede o no puede administrarse por una vía de administración idéntica. En algunas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción puede administrarse a través de múltiples vías de administración de manera simultánea o posterior a otras dosis del mismo o diferente anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción.

En ciertas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción se administra de manera profiláctica o terapéutica a un sujeto. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción puede administrarse de manera profiláctica o terapéutica a un sujeto para prevenir, disminuir o mejorar una enfermedad o síntoma de esta.

5.8 Terapia génica

En una modalidad específica, los ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican anticuerpos o derivados funcionales de estos, se administran a un sujeto para su uso en un método proporcionado en la presente descripción, por ejemplo, para prevenir, manejar, tratar y/o mejorar una enfermedad, trastorno o condición mediada por IL-1 β , por medio de terapia génica. Tal terapia abarca aquella realizada mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En una modalidad, los ácidos nucleicos producen su anticuerpo codificado, y el anticuerpo media en un efecto profiláctico o terapéutico.

Puede usarse cualquiera de los métodos para la expresión génica (o terapia génica) recombinante disponible en la técnica.

Para la revisión general de los métodos de terapia génica, ver Goldspiel *et al.*, 1993, Clinical Pharmacy 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; mayo de 1993, TIBTECH 11(5):155-215. Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología del ADN recombinante que se pueden usar se describen en Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990).

En una modalidad específica, una composición comprende ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo proporcionado en la presente descripción, los ácidos nucleicos son parte de un vector de expresión que expresa el anticuerpo o proteínas quiméricas o cadenas pesadas o ligeras de estos en un huésped adecuado. En particular, tales ácidos

nucleicos tienen promotores, tales como promotores heterólogos, unidos operativamente a la región codificante de anticuerpo, en donde el promotor es inducible o constitutivo y, opcionalmente, específico de tejido. En otra modalidad particular, se usan moléculas de ácido nucleico en las que las secuencias codificantes de anticuerpo y cualquier otra
5 secuencia deseada están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, lo que proporciona, por lo tanto, la expresión intracrosomal del anticuerpo que codifica los ácidos nucleicos (Koller y Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; Zijlstra *et al.*, 1989, Nature 342: 435-438).

El suministro de los ácidos nucleicos en un sujeto puede ser directo, en
10 cuyo caso el sujeto está directamente expuesto al ácido nucleico o a los vectores portadores de ácido nucleico, o indirecto, en cuyo caso las células se transforman primero con los ácidos nucleicos *in vitro*, y después se trasplantan al sujeto. Estos dos métodos se conocen, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

En una modalidad específica, las secuencias de ácido nucleico (*p. ej.*, ADN o
15 ARNm) se administran directamente *in vivo*, donde las secuencias se expresan para producir el producto codificado. Esto puede lograrse mediante cualquiera de los numerosos métodos conocidos en la técnica, *p. ej.*, construyéndolos como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrando el vector para que las secuencias se vuelvan intracelulares, *p. ej.*, por infección usando vectores retrovirales
20 defectuosos o atenuados u otros vectores virales (ver la patente de los EE. UU. núm. 4.980.286), o mediante inyección directa de ADN o ARNm desnudo, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (*p. ej.*, una pistola de genética; Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección,

encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas, o administrándolos en enlace con un péptido, que se sabe que ingresa al núcleo, administrándolo en enlace a un ligando sujeto a endocitosis mediada por receptores (ver, *p. ej.*, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432) (que pueden usarse para los tipos de células diana que expresan específicamente los receptores), etc. En otra modalidad, pueden formarse complejos de ácido nucleico-ligando en los que el ligando comprende un péptido viral fusogénico para interrumpir los endosomas, lo que permite que el ácido nucleico evite la degradación lisosómica. En aun otra modalidad, el ácido nucleico puede dirigirse *in vivo* para la captación y expresión específica de células, al dirigirse a un receptor específico (ver, *p. ej.*, las publicaciones PCT núms. WO 92/06180; WO 92/22635; WO 92/20316; W093/14188, WO 93/20221). Alternativamente, el ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula huésped para la expresión, mediante recombinación homóloga (Koller y Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; y Zijlstra *et al.*, 1989, Nature 342: 435-438).

En una modalidad específica, se usan vectores virales que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo. Por ejemplo, puede usarse un vector retroviral (ver Miller *et al.*, 1993, Meth. Enzymol. 217:581-599). Estos vectores retrovirales contienen los componentes necesarios para el correcto empaquetamiento del genoma viral e integración en el ADN de la célula huésped. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo que se usarán en la terapia génica pueden clonarse en uno o más vectores, lo que facilita la administración del gen en un sujeto. Se pueden encontrar más detalles sobre los vectores retrovirales en Boesen *et al.*, 1994, Biotherapy 6: 291-302, que describe el uso de un vector retroviral para suministrar el gen MDR1 a

las células madre hematopoyéticas para hacer que las células madre sean más resistentes a la quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovirales en terapia génica son: Clowes *et al.*, 1994, J. Clin. Invest. 93:644-651; Klein *et al.*, 1994, Blood 83: 1467-1473; Salmons y Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4:129-141; y Grossman y Wilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114.

Los adenovirus son otros vectores virales que pueden usarse en la producción recombinante de anticuerpos. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos para suministrar genes a epitelios respiratorios. Los adenovirus infectan naturalmente los epitelios respiratorios donde causan una enfermedad leve. Otros diana para sistemas de suministro basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, las células endoteliales y el músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaces de infectar células que no se dividen. Kozarsky y Wilson, 1993, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503 presentan una revisión de la terapia génica basada en adenovirus. Bout *et al.*, 1994, Human Gene Therapy 5:3-10 demostraron el uso de vectores de adenovirus para transferir genes a los epitelios respiratorios de monos rhesus. Otros casos del uso de adenovirus en terapia génica pueden encontrarse en Rosenfeld *et al.*, 1991, Science 252: 431-434; Rosenfeld *et al.*, 1992, Cell 68: 143-155; Mastrangeli *et al.*, 1993, J. Clin. Invest. 91:225-234; publicación del PCT núm. W094/12649; y Wang *et al.*, 1995, Gene Therapy 2: 775-783. En una modalidad específica, se usan vectores de adenovirus.

El virus adenoasociado (AAV, por sus siglas en inglés) también puede usarse (Walsh *et al.*, 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300; y la patente de los EE. UU. núm. 5.436.146). En una modalidad específica, los vectores de AAV se usan para

expresar un anticuerpo anti-IL-1 β como se proporciona en la presente descripción. En ciertas modalidades, el AAV comprende un ácido nucleico que codifica un dominio de VH. En otras modalidades, el AAV comprende un ácido nucleico que codifica un dominio de VL. En ciertas modalidades, el AAV comprende un ácido nucleico que codifica un dominio de VH y un dominio de VL. En algunas modalidades de los métodos proporcionados en la presente descripción, se administra a un sujeto un AAV que comprende un ácido nucleico que codifica un dominio de VH y un AAV que comprende un ácido nucleico que codifica un dominio de VL. En otras modalidades, se administra a un sujeto un AAV que comprende un ácido nucleico que codifica un dominio de VH y un dominio de VL. En ciertas modalidades, los dominios de VH y VL se sobreexpresan.

Otro enfoque para la terapia génica implica transferir un gen a células en cultivo tisular mediante métodos como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio o infección viral. Usualmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Después, las células se colocan bajo selección para aislar las células que se han absorbido y que expresan el gen transferido. Después, esas células se suministran a un sujeto.

En esta modalidad, el ácido nucleico se introduce en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Tal introducción puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o bacteriófago que contiene las secuencias de ácido nucleico, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por microcélulas, fusión esferoplast, etc. Se conocen numerosas técnicas en la técnica para la introducción de

genes extraños en células (ver, *p. ej.*, Loeffler and Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217:599-618; Cohen *et al.*, 1993, Meth. Enzymol. 217:618-644; Clín. Pharma. Ther. 29:69-92 (1985)) y pueden usarse de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente descripción, siempre que no se interrumpan las funciones fisiológicas y de desarrollo
5 necesarias de las células receptoras. La técnica debe proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de tal manera que el ácido nucleico sea expresable en la célula, tal como heredable y expresable en su progenie celular.

Las células recombinantes resultantes pueden administrarse a un sujeto mediante varios métodos conocidos en la técnica. Las células sanguíneas recombinantes
10 (*p. ej.*, células madre hematopoyéticas o progenitoras) pueden administrarse por vía intravenosa. La cantidad de células previstas para su uso depende del efecto deseado, estado del paciente, etc., y puede ser determinada por un experto en la técnica.

Las células en las que puede introducirse un ácido nucleico para propósitos de terapia génica abarcan cualquier tipo de célula disponible deseado, y que incluye,
15 pero no se limita a, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas, tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; varias células madre o progenitoras, en particular células madre hematopoyéticas o células progenitoras, *p. ej.*, como las obtenidas de
20 médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc.

En una modalidad específica, la célula usada para la terapia génica es autóloga del sujeto.

En una modalidad en la que las células recombinantes se usan en terapia génica, las secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo se introducen en las células de tal manera que sean expresables en las células o su progenie, y las células recombinantes se administran después *in vivo* para el efecto terapéutico. En una modalidad específica, se usan células madre o progenitoras. Cualquier célula madre y/o progenitora que puede aislarse y mantenerse *in vitro* puede potencialmente usarse de acuerdo con esta modalidad de los métodos proporcionados en la presente descripción (ver, *p. ej.*, la publicación PCT núm. WO 94/08598; Stemple y Anderson, 1992, Cell 71:973-985; Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A:229; y Pittelkow y Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771).

En una modalidad específica, el ácido nucleico que se introducirá para fines de terapia génica comprende un promotor inducible unido operativamente a la región codificante, de tal manera que la expresión del ácido nucleico es controlable mediante el control de la presencia o ausencia de un inductor de transcripción adecuado.

5.9. Ensayos y métodos de diagnóstico

Los anticuerpos marcados y los derivados y análogos de estos, que se unen inmuno-específicamente a un antígeno IL-1 β pueden usarse con fines de diagnóstico para detectar, diagnosticar o monitorizar una enfermedad mediada por IL-1 β . Por lo tanto, en la presente descripción se proporcionan métodos para la detección de una enfermedad mediada por IL-1 β que comprende: (a) ensayar la expresión de un antígeno IL-1 β en células o una muestra de tejido de un sujeto usando uno o más anticuerpos proporcionados en la presente descripción que se unen inmuno-específicamente al antígeno IL-1 β ; y (b) comparar el nivel del antígeno IL-1 β con un nivel de control, *p. ej.*,

niveles en muestras de tejido normal (*p. ej.*, de un paciente que no tiene una enfermedad mediada por IL-1 β , o del mismo paciente antes del inicio de la enfermedad), por lo que un aumento en el nivel analizado del antígeno IL-1 β en comparación con el nivel de control del antígeno IL-1 β es indicativo de una enfermedad mediada por IL-1 β .

5 También, se proporciona en la presente descripción un ensayo diagnóstico para diagnosticar una enfermedad mediada por IL-1 β que comprende: (a) ensayar el nivel de un antígeno IL-1 β en células o una muestra de tejido de un individuo usando uno o más anticuerpos proporcionados en la presente descripción que se unen inmuno-específicamente a un antígeno IL-1 β ; y (b) comparar el nivel del antígeno IL-1 β con un nivel de control, *p. ej.*, los niveles en muestras de tejido normal, donde un aumento en el nivel de antígeno IL-1 β ensayado en comparación con el nivel de control del antígeno IL-1 β es indicativo de una enfermedad mediada por IL-1 β . En ciertas modalidades, en la presente descripción se proporciona un método para tratar una enfermedad mediada por IL-1 β en un sujeto, que comprende: (a) ensayar el nivel de un antígeno IL-1 β en las células o una muestra tisular del sujeto usando uno o más anticuerpos proporcionados en la presente descripción que se unen inmuno-específicamente a un antígeno IL-1 β ; y (b) comparar el nivel del antígeno IL-1 β con un nivel de control, *p. ej.*, los niveles en muestras de tejido normal, donde un aumento en el nivel de antígeno IL-1 β ensayado en comparación con el nivel de control del antígeno IL-1 β es indicativo de una enfermedad mediada por IL-1 β . En algunas modalidades, el método comprende además (c) administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo proporcionado en la presente descripción al sujeto identificado como que tiene la enfermedad mediada por IL-1 β . Un diagnóstico más

definitivo de una enfermedad mediada por IL-1 β puede permitir que los profesionales de la salud empleen medidas preventivas o un tratamiento agresivo antes, evitando así el desarrollo o la progresión adicional de la enfermedad mediada por IL-1 β .

Los anticuerpos proporcionados en la presente descripción pueden usarse
5 para ensayar niveles de antígeno IL-1 β en una muestra biológica usando métodos inmunohistológicos clásicos como se describe en la presente descripción o como conocen los expertos en la técnica (*p. ej.*, ver Jalkanen *et al.*, 1985, J. Cell. Biol. 101:976-985; y Jalkanen *et al.*, 1987, J. Cell. Biol. 105:3087-3096). Otros métodos basados en anticuerpo útiles para detectar la expresión génica de proteínas incluyen
10 inmunoensayos, tales como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Los marcadores de ensayo de anticuerpos adecuados son conocidos en la técnica e incluyen marcadores enzimáticos, tales como la glucosa oxidasa; radioisótopos, tales como yodo (¹²⁵I, ¹²¹I), carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), tritio (³H), indio (¹²¹In) y tecnecio (⁹⁹Tc); marcadores luminiscentes, tales como luminol; y
15 marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina.

Un aspecto proporcionado en la presente descripción es la detección y diagnóstico de una enfermedad mediada por IL-1 β en un ser humano. En una modalidad, el diagnóstico comprende: a) administrar (por ejemplo, parenteral, subcutánea o intraperitoneal) a un sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo
20 marcado que se une inmunoespecíficamente a un antígeno IL-1 β ; b) esperar un intervalo de tiempo después de la administración para permitir que el anticuerpo marcado se concentre en sitios en el sujeto donde se expresa el antígeno IL-1 β (y para la molécula marcada no unida se depurará al nivel de fondo); c) determinar el

nivel de fondo; y d) detectar el anticuerpo marcado en el sujeto, de tal manera que la detección del anticuerpo marcado por encima del nivel de fondo indica que el sujeto tiene una enfermedad mediada por IL-1 β . El nivel de fondo puede determinarse mediante diversos métodos, incluyendo, comparar la cantidad de molécula marcada detectada con un valor estándar previamente determinado para un sistema particular.

Se entenderá en la técnica que el tamaño del sujeto y el sistema de formación de imágenes usado determinará la cantidad de entidad de formación de imágenes necesaria para producir imágenes de diagnóstico. En el caso de una entidad radioisotópica, para un sujeto humano, la cantidad de radioactividad inyectada normalmente variará de aproximadamente 5 a 20 milicuries de ⁹⁹Tc. Después, el anticuerpo marcado se acumulará en la ubicación de las células que contienen la proteína específica. Las imágenes tumorales *in vivo* se describen en S.W. Burchiel *et al.*, “Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments”. (Chapter 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel y B.A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982).

Dependiendo de varias variables, que incluyen el tipo de marcador usado y el modo de administración, el intervalo de tiempo después de la administración para permitir que el anticuerpo marcado se concentre en sitios en el sujeto y para que el anticuerpo marcado no unido se elimine al nivel de fondo es de 6 a 48 horas o de 6 a 24 horas o de 6 a 12 horas. En otra modalidad, el intervalo de tiempo después de la administración es de 5 a 20 días o de 5 a 10 días.

En una modalidad, el monitoreo de una enfermedad mediada por IL-1 β se lleva a cabo mediante la repetición del método para diagnosticar la enfermedad

mediada por IL-1 β , por ejemplo, un mes después del diagnóstico inicial, seis meses después del diagnóstico inicial, un año después del diagnóstico inicial, etc.

La presencia de la molécula marcada puede detectarse en el sujeto usando métodos conocidos en la técnica para la exploración *in vivo*. Estos métodos dependen
5 del tipo de marcador usado. Los expertos en la técnica serán capaces de determinar el método adecuado para detectar un marcador particular. Los métodos y dispositivos que pueden usarse en los métodos de diagnóstico proporcionados en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, tomografía computarizada (TC), exploración de cuerpo completo tal como tomografía por emisión de positrones (PET,
10 por sus siglas en inglés), imágenes por resonancia magnética (IRM) y sonografía.

En una modalidad específica, la molécula se marca con un radioisótopo y se detecta en el paciente usando un instrumento quirúrgico sensible a la radiación (Thurston *et al.*, patente de los EE. UU. núm. 5.441.050). En otra modalidad, la molécula se marca con un compuesto fluorescente y se detecta en el paciente usando un instrumento de
15 exploración sensible a fluorescencia. En otra modalidad, la molécula se marca con un metal emisor de positrones y se detecta en el paciente usando tomografía por emisión de positrones. En aun otra modalidad, la molécula se marca con un marcador paramagnético y se detecta en un paciente usando imágenes por resonancia magnética (IRM).

5.10 Kits

20 En la presente descripción también se proporcionan kits que comprenden un anticuerpo (*p. ej.*, un anticuerpo anti-IL-1 β) proporcionado en la presente descripción, o una composición (*p. ej.*, una composición farmacéutica) de este, envasada en un material de envasado adecuado. Un kit incluye opcionalmente una

etiqueta o encarte de envase que incluye una descripción de los componentes o instrucciones de uso *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo* los componentes en este.

El término “material de envasado” se refiere a una estructura física que aloja los componentes del kit. El material de envasado puede mantener los componentes esterilizados, y puede estar elaborado de material comúnmente usado para tales fines (p. ej., papel, fibra corrugada, vidrio, plástico, láminas, ampollas, viales, tubos, etc.).

Los kits proporcionados en la presente descripción pueden incluir etiquetas o prospectos. Las etiquetas o encartes incluyen “materia impresa”, p. ej., papel o cartón, separado o fijado a un componente, un kit o material de envasado (p. ej., una caja), o unido, por ejemplo, a una ampolla, tubo o vial que contiene un componente del kit. Las etiquetas o encartes pueden incluir adicionalmente un medio legible por computador, tal como un disco (p. ej., disco duro, tarjeta, disco de memoria), disco óptico tal como CD o DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, cinta magnética o un medio de almacenamiento eléctrico, tal como RAM y ROM o híbridos de estos tales como medios de almacenamiento magnético/óptico, medios de FLASH, o tarjetas de tipo memoria. Las etiquetas o prospectos pueden incluir información que identifica información del fabricante, números de lote, ubicación del fabricante y fecha.

Los kits proporcionados en la presente descripción pueden incluir, además, otros componentes. Cada componente del kit puede estar encerrado dentro de un recipiente individual, y todos los varios recipientes pueden estar dentro de un solo empaque. Los kits también pueden diseñarse para almacenamiento en frío. Un kit puede diseñarse además para contener anticuerpos proporcionados en la presente descripción, o células que contienen ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos

proporcionados en la presente descripción. Las células en el kit pueden mantenerse bajo condiciones de almacenamiento adecuadas hasta que estén listas para usar.

En la presente descripción, también se proporcionan paneles de anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un antígeno IL-1 β . En modalidades específicas, en la presente descripción se proporcionan paneles de anticuerpos que tienen diferentes constantes de velocidad de asociación, diferentes constantes de velocidad de disociación, diferentes afinidades por un antígeno IL-1 β y/o diferentes especificidades por un antígeno IL-1 β . En ciertas modalidades, en la presente descripción se proporcionan paneles de aproximadamente 10, preferentemente aproximadamente 25, aproximadamente 50, aproximadamente 75, aproximadamente 100, aproximadamente 125, aproximadamente 150, aproximadamente 175, aproximadamente 200, aproximadamente 250, aproximadamente 300, aproximadamente 350, aproximadamente 400, aproximadamente 450, aproximadamente 500, aproximadamente 550, aproximadamente 600, aproximadamente 650, aproximadamente 700, aproximadamente 750, aproximadamente 800, aproximadamente 850, aproximadamente 900, aproximadamente 950, o aproximadamente 1000 anticuerpos o más. Los paneles de anticuerpos pueden usarse, por ejemplo, en placas de 96 pocillos o 384 pocillos, para ensayos tales como ELISA.

A menos que se definan de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado como lo entiende comúnmente un experto en la técnica al que pertenece esta descripción. Si bien pueden usarse métodos o materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción en la práctica o pruebas de la presente invención, en la presente descripción se describen métodos y materiales apropiados.

Como se usa en la presente descripción, los valores numéricos se presentan, frecuentemente, en un formato de rango a lo largo de este documento. El uso de un formato de rango es simplemente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la invención, a menos que el contexto indique claramente de cualquier otra manera. En consecuencia, el uso de un rango incluye expresamente todos los subrangos posibles, todos los valores numéricos individuales dentro de ese rango y todos los valores numéricos o rangos numéricos, incluidos los enteros dentro de tales rangos y fracciones de los valores o los enteros dentro de los rangos, a menos que el contexto indique claramente de cualquier otra manera. Esta construcción se aplica independientemente de la amplitud del rango y en todos los contextos a lo largo de este documento de patente. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a un rango de 90-100 % incluye 91-99 %, 92-98 %, 93-95 %, 91-98 %, 91-97 %, 91-96 %, 91-95 %, 91-94 %, 91-93 %, y así sucesivamente. La referencia a un rango de 90-100 % también incluye 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95 %, 97 %, etc., así como 91,1 %, 91,2 %, 91,3 %, 91,4 %, 91,5 %, etc., 92,1 %, 92,2 %, 92,3 %, 92,4 %, 92,5 %, etc., y así sucesivamente.

Además, la referencia a un rango de 1-3, 3-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150, 150-160, 160-170, 170-180, 180-190, 190-200, 200-225, 225-250 incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etc. En un ejemplo adicional, la referencia a un rango de 25-250, 250-500, 500-1000, 1000-2500, 2500-5000, 5000-25.000, 25.000-50.000 incluye cualquier valor numérico o rango dentro o que abarca tales valores, *p. ej.*, 25, 26, 27, 28, 29...250, 251, 252, 253, 254...500, 501, 502, 503, 504..., etc.

Como también se usa en la presente descripción, se describen en este documento una serie de rangos. El uso de una serie de rangos incluyen combinaciones de los rangos superior e inferior para proporcionar otro rango. Esta construcción se aplica independientemente de la amplitud del rango y en todos los contextos a lo largo de este documento de patente. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a una serie de rangos tales como 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-75, 75-100, 100-150, incluye rangos tales como 5-20, 5-30, 5-40, 5-50, 5-75, 5-100, 5-150, y 10-30, 10-40, 10-50, 10-75, 10-100, 10-150, y 20-40, 20-50, 20-75, 20-100, 20-150, y así sucesivamente.

En aras de la concisión, en la presente descripción se usan ciertas abreviaturas. Un ejemplo es la abreviatura de una sola letra para representar residuos de aminoácidos. Los aminoácidos y sus correspondientes tres letras y abreviaturas de una sola letra son como sigue:

alanina	Ala	(A):
arginina	Arg	(R)
asparagina	Asn	(N)
ácido aspártico	Asp	(D)
cisteína	Cys	(C)
ácido glutámico	Glu	(E)
glutamina	Gln	(Q)
glicina	Gly	(G)
histidina	His	(H)
isoleucina	Ile	(I)
leucina	Leu	(L)
lisina	Lys	(K)
metionina	Met	(M)
fenilalanina	Phe	(F)
prolina	Pro	(P)
serina	Ser	(S)

treonina	Tre	(T)
triptófano	Trp	(W)
tirosina	Tyr	(Y)
valina	Val	(V)

La invención se describe generalmente en la presente descripción con el uso de lenguaje afirmativo para describir las numerosas modalidades. La descripción también incluye específicamente modalidades en las cuales el tema particular se excluye, en su totalidad o en parte, tal como sustancias o materiales, etapas y condiciones de métodos, protocolos, procedimientos, ensayos o análisis. Por lo tanto, aunque la invención generalmente no se expresa en la presente descripción en términos de lo que la descripción no incluye, los aspectos que no se incluyen expresamente en la presente descripción se describen, no obstante, en la presente descripción.

Se han descrito varias modalidades de la invención. Sin embargo, se entenderá que pueden realizarse varias modificaciones sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. En consecuencia, los ejemplos siguientes se destinan para ilustrar, pero sin limitar, el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

6. MODALIDADES

Esta invención proporciona las siguientes modalidades no limitantes.

En un conjunto de modalidades, se proporciona:

1. Un anticuerpo que se une a IL-1 β que comprende:

- (1) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, y una CDR3 de VH que tienen una secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, y una CDR3 de VH, respectivamente, de una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 7; y (ii) una VL que comprende una CDR1 de VL, una CDR2 de VL, y una CDR3 de VL que

tienen una secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, una CDR2 de VL, y una CDR3 de VL, respectivamente, de una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 8;

(2) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, y una CDR3 de VH que tienen una secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, y una CDR3 de VH, respectivamente, de una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 9; y (ii) una VL que comprende una CDR1 de VL, una CDR2 de VL, y una CDR3 de VL que tienen una secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, una CDR2 de VL, y una CDR3 de VL, respectivamente, de una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 10; o

(3) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, y una CDR3 de VH que tienen una secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, y una CDR3 de VH, respectivamente, de una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 11; y (ii) una VL que comprende una CDR1 de VL, una CDR2 de VL, y una CDR3 de VL que tienen una secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, una CDR2 de VL, y una CDR3 de VL, respectivamente, de una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 12.

2. El anticuerpo de la modalidad 1, (i) en donde las secuencias de aminoácidos de la CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL están de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat; (ii) en donde las secuencias de aminoácidos de la CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH,

CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL están de acuerdo con el sistema de numeración de Chothia; (iii) en donde las secuencias de aminoácidos de la CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL están de acuerdo con el sistema de numeración de AbM; (iv) en donde las

5 secuencias de aminoácidos de la CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL están de acuerdo con el sistema de numeración de Contact; y/o (v) en donde las secuencias de aminoácidos de la CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL están de acuerdo con el sistema de numeración de IMGT.

10 3. Un anticuerpo que se une a IL-1 β que comprende:

- (1) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 13, sec. con núm. de ident.: 31, sec. con núm. de ident.: 49, sec. con núm. de ident.: 67, y sec. con núm. de ident.: 85; una CDR2 de VH que tiene una
- 15 secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 14, sec. con núm. de ident.: 32, sec. con núm. de ident.: 50, sec. con núm. de ident.: 68, y sec. con núm. de ident.: 86; una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 15, sec. con núm. de ident.: 33, sec. con núm. de ident.: 51,
- 20 sec. con núm. de ident.: 69, y sec. con núm. de ident.: 87; y
- (ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 16, sec. con núm. de ident.: 34, sec. con núm. de ident.: 52, sec. con núm. de ident.:

70, y sec. con núm. de ident.: 88; una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 17, sec. con núm. de ident.: 35, sec. con núm. de ident.: 53, sec. con núm. de ident.: 71, y sec. con núm. de ident.: 89; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 18, sec. con núm. de ident.: 36, sec. con núm. de ident.: 54, sec. con núm. de ident.: 72, y sec. con núm. de ident.: 90;

- (2) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 19, sec. con núm. de ident.: 37, sec. con núm. de ident.: 55, sec. con núm. de ident.: 73, y sec. con núm. de ident.: 91; una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 20, sec. con núm. de ident.: 38, sec. con núm. de ident.: 56, sec. con núm. de ident.: 74, y sec. con núm. de ident.: 92; una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 21, sec. con núm. de ident.: 39, sec. con núm. de ident.: 57, sec. con núm. de ident.: 75, y sec. con núm. de ident.: 93; y
- (ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 22, sec. con núm. de ident.: 40, sec. con núm. de ident.: 58, sec. con núm. de ident.: 76, y sec. con núm. de ident.: 94; una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 23, sec. con núm. de ident.: 41, sec. con núm. de ident.: 59, sec. con

núm. de ident.: 77, y sec. con núm. de ident.: 95; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 24, sec. con núm. de ident.: 42, sec. con núm. de ident.: 60, sec. con núm. de ident.: 78, y sec. con núm. de ident.: 96; o

- 5 (3) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 25, sec. con núm. de ident.: 43, sec. con núm. de ident.: 61, sec. con núm. de ident.: 79, y sec. con núm. de ident.: 97; una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 26, sec. con núm. de ident.: 44, sec. con núm. de ident.: 62, sec. con núm. de ident.: 80, y sec. con núm. de ident.: 98; una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 27, sec. con núm. de ident.: 45, sec. con núm. de ident.: 63, sec. con núm. de ident.: 81, y sec. con núm. de ident.: 99; y
- 10
- 15 (ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 28, sec. con núm. de ident.: 46, sec. con núm. de ident.: 64, sec. con núm. de ident.: 82, y sec. con núm. de ident.: 100; una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 29, sec. con núm. de ident.: 47, sec. con núm. de ident.: 65, sec. con núm. de ident.: 83, y sec. con núm. de ident.: 101; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm.
- 20

de ident.: 30, sec. con núm. de ident.: 48, sec. con núm. de ident.: 66,
sec. con núm. de ident.: 84, y sec. con núm. de ident.: 102.

4. Un anticuerpo que se une a IL-1 β que comprende:

(1) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de
5 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 13; una CDR2 de VH que
tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 14;
una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec.
con núm. de ident.: 15; y

(ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de
10 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 16; una CDR2 de VL que
tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm.
de ident.: 17; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos
de la sec. con núm. de ident.: 18;

(2) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de
15 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 19; una CDR2 de VH que
tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20;
una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec.
con núm. de ident.: 21; y

(ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de
20 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 22; una CDR2 de VL que
tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm.
de ident.: 23; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos
de la sec. con núm. de ident.: 24;

- (3) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 25; una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 26; una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 27; y
- (ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 28; una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 29; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 30;
- (4) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 31; una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 32; una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 33; y
- (ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 34; una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 35; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 36;
- (5) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 37; una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 38;

una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec.
con núm. de ident.: 39; y

(ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de
aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 40; una CDR2 de VL que
5 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm.
de ident.: 41; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos
de la sec. con núm. de ident.: 42;

(6) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de
aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 43; una CDR2 de VH que
10 tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 44;
una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec.
con núm. de ident.: 45; y

(ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de
aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 46; una CDR2 de VL que
15 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm.
de ident.: 47; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos
de la sec. con núm. de ident.: 48;

(7) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de
aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 49; una CDR2 de VH que
20 tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 50;
una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec.
con núm. de ident.: 51; y

(ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 52; una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 53; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 54;

(8) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 55; una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 56; una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 57; y

(ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 58; una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 59; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 60;

(9) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 61; una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 62; una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 63; y

(ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 64; una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm.

de ident.: 65; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 66;

- (10) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 67; una CDR2 de VH que
5 tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 68; una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 69; y

- (ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 70; una CDR2 de VL que
10 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 71; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 72;

- (11) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 73; una CDR2 de VH que
15 tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 74; una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 75; y

- (ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 76; una CDR2 de VL que
20 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 77; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 78;

(12) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 79; una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 80; una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 81; y

(ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 82; una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 83; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 84;

(13) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 85; una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 86; una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 87; y

(ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 88; una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 89; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 90;

(14) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 91; una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 92;

una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 93; y

(ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 94; una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 95; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 96; o

(15) (i) una VH que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 97; una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 98; una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 99; y

(ii) una VL que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 100; una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 101; una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 102.

5. El anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1 a 4, en donde el anticuerpo comprende además una o más regiones marco como se establece en la sec. con núm. de ident.: 7, la sec. con núm. de ident.: 8, la sec. con núm. de ident.: 9, la sec. con núm. de ident.: 10, la sec. con núm. de ident.: 11 y/o la sec. con núm. de ident.: 12.

6. El anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1 a 5, en donde:

(i) el anticuerpo comprende una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 7, y una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 8;

(ii) el anticuerpo comprende una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 9, y una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 10; o

(iii) el anticuerpo comprende una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 11, y una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 12.

- 10 7. El anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1 a 6, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
8. El anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1 a 7, en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG.
9. El anticuerpo de la modalidad 8, en donde el anticuerpo IgG es un anticuerpo
15 IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
10. El anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1 a 9, en donde el anticuerpo comprende una cadena ligera kappa.
11. El anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1 a 9, en donde el anticuerpo comprende una cadena ligera lambda.
- 20 12. El anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1 a 11, en donde el anticuerpo comprende una región Fc mutante.
13. El anticuerpo de la modalidad 12, en donde la región Fc mutante comprende mutaciones M252Y/S254T/T256E (YTE).

14. El anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1 a 13, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
15. El anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1 a 14, en donde el anticuerpo se une a un antígeno IL-1 β .
- 5 16. El anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1 a 14, en donde el anticuerpo se une a un epítipo de IL-1 β .
17. El anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1 a 14, en donde el anticuerpo se une específicamente a IL-1 β .
18. El anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1 a 17, en donde la CDR1
10 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL forman un sitio de unión para un antígeno del IL-1 β .
19. El anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1 a 15, en donde la CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL forman un sitio de unión para un epítipo de IL-1 β .
- 15 20. El anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1 a 19, en donde el anticuerpo es multiespecífico.
21. El anticuerpo de la modalidad 20, en donde el anticuerpo es capaz de unirse a al menos dos antígenos.
22. El anticuerpo de la modalidad 20, en donde el anticuerpo es capaz de unirse a
20 al menos tres antígenos.
23. El anticuerpo de la modalidad 20, en donde el anticuerpo es capaz de unirse a al menos cuatro antígenos.

24. El anticuerpo de la modalidad 20, en donde el anticuerpo es capaz de unirse a al menos cinco antígenos.
25. Una molécula de unión que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1 a 24, en donde el anticuerpo se fusiona genéticamente o se
5 conjuga químicamente con un agente.
26. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1 a 24.
27. Un vector que comprende el ácido nucleico de la modalidad 26.
28. Una célula huésped que comprende el vector de la modalidad 27.
- 10 29. Un kit que comprende el vector de la modalidad 27 y el envase para el mismo.
30. Un kit que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1 a 24 y el envase para el mismo.
31. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1 a 24 y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 15 32. Un método para producir la composición farmacéutica de la modalidad 31, que comprende combinar el anticuerpo con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para obtener la composición farmacéutica.
33. Un método para inhibir la señalización mediada por IL-1 β o IL-1 β en una célula, que comprende poner en contacto la célula con el anticuerpo de una cualquiera
20 de las modalidades 1 a 24.
34. Un método para inhibir la producción inducida por IL-1 β de IL-6, ENA-78 (CXCL5) y/o G-CSF en una célula, que comprende poner en contacto la célula con el anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1 a 24.

35. Un método para disminuir la producción de IL-6, ENA-78 (CXCL5) y/o G-CSF en una célula, que comprende poner en contacto la célula con el anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1 a 24.
36. Un método para inhibir el crecimiento o proliferación de células que expresan IL-1 β , que comprende poner en contacto las células con el anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1 a 24.
37. El método de una cualquiera de las modalidades 33 a 36, en donde la célula o las células están en un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno.
38. Un método para inhibir IL-1 β en un sujeto, que comprende administrar al sujeto el anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1 a 24.
39. Un método para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto el anticuerpo de una cualquiera de las modalidades 1 a 24.
40. El método de la modalidad 37 o 39, en donde la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno asociado a IL-1 β .
41. El método de la modalidad 40, en donde la enfermedad o trastorno asociado a IL-1 β es una enfermedad o trastorno inflamatorio.
42. El método de la modalidad 40, en donde la enfermedad o trastorno asociado a IL-1 β es cáncer.
43. El método de la modalidad 42, en donde el cáncer es cáncer de pulmón.
44. El método de la modalidad 43, en donde el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón de células no pequeñas, en donde opcionalmente el cáncer de pulmón de células no pequeñas ha alcanzado la etapa 0, la etapa 1, la etapa 2, la etapa 3 o la etapa 4.
45. El método de la modalidad 42, en donde el cáncer es cáncer de riñón.

46. El método de la modalidad 45, en donde el cáncer de riñón es un cáncer de células renales.
47. El método de la modalidad 46, en donde el cáncer de células renales ha alcanzado la etapa 1, la etapa 2 o la etapa 3.
- 5 48. Una proteína aislada que comprende un dominio de unión al antígeno que se une al hIL-1 β , en donde dicho dominio de unión al antígeno se une a un epítipo en hIL-1 β que tiene una secuencia que se selecciona de los epítopos identificados en la Figura 1.
49. La proteína aislada de la modalidad 48, en donde la proteína aislada se une al
10 (a los) mismo(s) epítipo(s) que de 05H21A.
50. La proteína aislada de la modalidad 48, en donde la proteína aislada se une al (a los) mismo(s) epítipo(s) que de 15N14A.
51. La proteína aislada de la modalidad 48, en donde la proteína aislada se une al (a los) mismo(s) epítipo(s) que de 08F17A.

15 En la presente descripción se describen modalidades particulares de esta invención. Después de leer la descripción anterior, las variaciones de las modalidades descritas pueden resultar evidentes para las personas que trabajan en la técnica, y se espera que los expertos en la técnica puedan usar tales variaciones según corresponda. En consecuencia, se pretende que la invención se practique de
20 cualquier otra manera a la descrita específicamente en la presente descripción, y que la invención incluya todas las modificaciones y equivalentes de la materia mencionada en las reivindicaciones anexadas a esto permitidas por la ley aplicable. Además, la invención abarca cualquier combinación de los elementos descritos

anteriormente en todas sus variaciones posibles a menos que se indique de cualquier otra manera en la presente descripción o que sea claramente contradictorio de cualquier otra manera en el contexto. Se han descrito varias modalidades de la invención. Sin embargo, se entenderá que pueden realizarse varias modificaciones sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. En consecuencia, las descripciones en la sección de ejemplos están destinadas a ilustrar, pero sin limitar, el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

7. EJEMPLOS

La siguiente es una descripción de los diversos métodos y materiales usados en los estudios, y se exponen para proporcionar a los expertos en la técnica una completa divulgación y descripción de cómo hacer y usar la presente descripción, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su descripción, ni pretenden representar que los experimentos a continuación se realizaron y son todos los experimentos que pueden realizarse. Debe entenderse que las descripciones ilustrativas escritas en tiempo presente no se realizaron necesariamente, sino que las descripciones pueden realizarse para generar los datos y lo similar asociados con las enseñanzas de la presente descripción. Se han realizado esfuerzos para garantizar precisión con respecto a los números usados (*p. ej.*, cantidades, temperatura, etc.), pero deben tenerse en cuenta algún error y desviación del experimento.

7.1 Ejemplo 1: Diseño, secuencia y estructura de la molécula mAb de IL-1 β

Se generaron moléculas de anticuerpo anti- IL-1 β potentes y de alta afinidad que son capaces de neutralizar la vía de señalización de IL-1 β . Se llevó a cabo una campaña de inmunización con ADN que codifica una variante de IL-1 β

humana con bioactividad reducida (D145K) en la plataforma de ratón transgénico de Alivamab. Tres principales (clones: 05H21A, 15N14A y 08F17A) descritos en la presente descripción se modificaron genéticamente Fc para incluir una mutación YTE (M252Y/S254T/T256E) para mejorar la vida media del anticuerpo.

5 Las secuencias de aminoácidos para la HC y la LC de los candidatos principales se muestran a continuación en la **Tabla 3**. Las secuencias de aminoácidos de VL y VH de los candidatos principales se muestran en la **Tabla 4**. Las 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) en cada cadena de los candidatos principales se muestran en la **Tabla 5** a la **Tabla 9**.

10 **Tabla 3.** Secuencias de AA de HC y LC de los mAb anti-IL-1 β principales

Nombre	Sec. AA de HC	Sec. AA de LC
05H21A Isotipo de cadena pesada: IgG1- YTE Isotipo de cadena ligera: Lambda	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCT FSGFSLSTSGMWVSWIRQPPGK ALEWLALIDWGDDKYYTTSKTR LTISKDTSKNQVVLMTNMDPVD TATYYCARMREGSRAFDIWGQG TVVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLYITREPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 1)	QSVLTQPPSVSEAPRQRVTISCS GSSSNIGDNAVNWYQQLPKGKAP KLLIYNDDLSSGVSDRFSGSKS GTSASLAISGLQSEDEADYYCAA WDDSLNGPVFGGGKTLTVLGQP KAAPSVTLFPPSSEELQANKATL VCLISDFYPGAVTVAWKADSSPV KAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGS TVEKTVAPTECS (sec. con núm. de ident.: 2)
15N14A	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCT VSGGSISSYYWTWIRQPAGKGL	QAVLTQPSSLSASPGASASLTCT LRSGINVGTYRIYWYQQKPGSP

Nombre	Sec. AA de HC	Sec. AA de LC
Isotipo de cadena pesada: IgG1-YTE Isotipo de cadena ligera: Lambda	EWIGRIDSSGSSKYNPTLKSRTV MSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA VYYCARGDSGYDWAFFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK KDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 3)	QYLLSYKSDSDKQQGSGVPSRF SGSKDASANVGILLISGLQSEDE ADYYCMIWHSSAWVFGGGTKLT VLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKY AASSYLSLTPEQWKSQRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS (sec. con núm. de ident.: 4)
08F17A Isotipo de cadena pesada: IgG1-YTE Isotipo de cadena ligera: Kappa	EVQLVESGGGLVTPGGSLRLSC AASGFTFSGYSMNWVRQAPGK GLEWVSSISSSSGYIYYADSVKG RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAE DTAIVYYCAREYWGSFGDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTV VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLYITREPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNQGPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCF SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 5)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQGISYYLAWYQQKPGKVPK LLISAEFTLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDVATYYCQKY NTAPRTFGQGTKEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC (sec. con núm. de ident.: 6)

Tabla 4. Secuencias de AA de VH y VL de los mAb anti-IL-1 β principales

Nombre	Sec. AA de VH	Sec. AA de VL
05H21A	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTF SGFSLSTSGMWVSWIRQPPGKAL EWLALIDWGDDKYYTTSKTRLTIS KDTSKNQVVLTMNMDPVDATY YCARMREGSRAFDIWGQGTVVTV SS (sec. con núm. de ident.: 7)	QSVLTQPPSVSEAPRQRVTISCS GSSSNIGDNAVNWYQQLP GKAP KLLIYNDDLSSGVSDRFSGSKS GTSASLAISGLQSEDEADYYCAA WDDSLNGPVFGGGTKLTVL (sec. con núm. de ident.: 8)
15N14A	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTV SGGSISSYYWTWIRQPAGKGLEW GRIDSSGSSKYNPTLKSRTMSVD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA RGDSGYDWAFDYWGQGTTLTVS S (sec. con núm. de ident.: 9)	QAVLTQPSSLSASPGASASLTCT LRSGINVGTYRIYWYQQKPGSPP QYLLSYKSDSDKQQGSGVPSRF SGSKDASANVGILLISGLQSEDE ADYYCMIWHSSAWVFGGGTKLT VL (sec. con núm. de ident.: 10)
08F17A	EVQLVESGGGLVTPGGSLRLSCA ASGFTFSGYSMNWVRQAPGKGLE WVSSISSSSGYIYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCAREYWGS GFDYWGQGTTLTV SS (sec. con núm. de ident.: 11)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQGISYYLAWYQQKPGKVPK LLISAEFTLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDVATYYCQKY NTAPRTFGGGTKVEIK (sec. con núm. de ident.: 12)

Tabla 5. Secuencias de AA de CDR de Kabat de los mAb anti-IL-1 β principales

Nombre	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
05H21A	TSGMWVS (sec. con núm. de ident.: 13)	LIDWGDDK YYTTSKLT (sec. con núm. de ident.: 14)	MREGSRA FDI (sec. con núm. de ident.: 15)	SGSSSNIG DNAVN (sec. con núm. de ident.: 16)	NDDLSS (sec. con núm. de ident.: 17)	AAWDDSL NGPV (sec. con núm. de ident.: 18)
15N14A	SYWT (sec. con núm. de ident.: 19)	RIDSSGSS KYNPTLKS (sec. con núm. de ident.: 20)	GDSGYDW AFDY (sec. con núm. de ident.: 21)	TLRSGINV GTYRIY (sec. con núm. de ident.: 22)	YKSDSDKQ QGS (sec. con núm. de ident.: 23)	MIWHSSA WV (sec. con núm. de ident.: 24)
08F17A	GYSMN (sec. con núm. de ident.: 25)	SISSSSGYI YADSVKG (sec. con núm. de ident.: 26)	EYWGS GF DY (sec. con núm. de ident.: 27)	RASQGISY YLA (sec. con núm. de ident.: 28)	AEFTLQS (sec. con núm. de ident.: 29)	QKYNTAPR T (sec. con núm. de ident.: 30)

		núm. de ident.: 26)				
--	--	------------------------	--	--	--	--

Tabla 6. Secuencias de AA de CDR de Chothia de los mAb anti-IL-1 β principales

Nombre	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
05H21A	GFSLSTSG M (sec. con núm. de ident.: 31)	DWGDD (sec. con núm. de ident.: 32)	MREGSRA FDI (sec. con núm. de ident.: 33)	SGSSSNIG DNAVN (sec. con núm. de ident.: 34)	NDDLSS (sec. con núm. de ident.: 35)	AAWDDSL NGPV (sec. con núm. de ident.: 36)
15N14A	GGSISSY (sec. con núm. de ident.: 37)	DSSGS (sec. con núm. de ident.: 38)	GDSGYDW AFDY (sec. con núm. de ident.: 39)	TLRSGINV GTYRIY (sec. con núm. de ident.: 40)	YKSDSDK QQGS (sec. con núm. de ident.: 41)	MIWHSSA WV (sec. con núm. de ident.: 42)
08F17A	GFTFSGY (sec. con núm. de ident.: 43)	SSSSGY (sec. con núm. de ident.: 44)	EYWGS GF DY (sec. con núm. de ident.: 45)	RASQGISY YLA (sec. con núm. de ident.: 46)	AEFTLQS (sec. con núm. de ident.: 47)	QKYNTAP RT (sec. con núm. de ident.: 48)

Tabla 7. Secuencias de AA de CDR de AbM de los mAb anti-IL-1 β principales

Nombre	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
05H21A	GFSLSTSG MWVS (sec. con núm. de ident.: 49)	LIDWGDDK Y (sec. con núm. de ident.: 50)	MREGSRA FDI (sec. con núm. de ident.: 51)	SGSSSNIG DNAVN (sec. con núm. de ident.: 52)	NDDLSS (sec. con núm. de ident.: 53)	AAWDDSL NGPV (sec. con núm. de ident.: 54)
15N14A	GGSISSY WT (sec. con núm. de ident.: 55)	RIDSSGSS K (sec. con núm. de ident.: 56)	GDSGYDW AFDY (sec. con núm. de ident.: 57)	TLRSGINV GTYRIY (sec. con núm. de ident.: 58)	YKSDSDKQ QGS (sec. con núm. de ident.: 59)	MIWHSSA WV (sec. con núm. de ident.: 60)
08F17A	GFTFSGYS MN (sec. con núm. de ident.: 61)	SISSSSGYI Y (sec. con núm. de ident.: 62)	EYWGS GF DY (sec. con núm. de ident.: 63)	RASQGISY YLA (sec. con núm. de ident.: 64)	AEFTLQS (sec. con núm. de ident.: 65)	QKYNTAPR T (sec. con núm. de ident.: 66)

Tabla 8. Poner en contacto las secuencias de AA de CDR de los mAb anti-IL-1 β

principales

Nombre	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
05H21A	STSGMWV S (sec. con número de ident.: 67)	WLALIDWG DDKY (sec. con número de ident.: 68)	ARMREGS RAFD (sec. con número de ident.: 69)	IGDNAVN WY (sec. con número de ident.: 70)	LLIYNDDL S (sec. con número de ident.: 71)	AAWDDSL NGP (sec. con número de ident.: 72)
15N14A	SSYYWT (sec. con número de ident.: 73)	WIGRIDSS GSSK (sec. con número de ident.: 74)	ARGDSGY DWAFFD (sec. con número de ident.: 75)	NVGTYRIY WY (sec. con número de ident.: 76)	YLLSYKSD SDKQQG (sec. con número de ident.: 77)	MIWHSSA W (sec. con número de ident.: 78)
08F17A	SGYSMN (sec. con número de ident.: 79)	WVSSISS SGIY (sec. con número de ident.: 80)	AREYWGS GFD (sec. con número de ident.: 81)	SYLAWY (sec. con número de ident.: 82)	LLISAEFTL Q7 (sec. con número de ident.: 83)	QKYNTAP R (sec. con número de ident.: 84)

Tabla 9. Secuencias de AA de CDR IMGT de los mAb anti-IL-1 β principales

Nombre	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
05H21A	GFSLSTSG MW (sec. con número de ident.: 85)	IDWGDDK (sec. con número de ident.: 86)	ARMREGS RAFDI (sec. con número de ident.: 87)	SSNIGDNA (sec. con número de ident.: 88)	NDD (sec. con número de ident.: 89)	AAWDDSL NGPV (sec. con número de ident.: 90)
15N14A	GGSISSYY (sec. con número de ident.: 91)	IDSSGSS (sec. con número de ident.: 92)	ARGDSGY DWAFFDY (sec. con número de ident.: 93)	SGINVTY R (sec. con número de ident.: 94)	YKSDSDK (sec. con número de ident.: 95)	MIWHSSA WV (sec. con número de ident.: 96)
08F17A	GFTFSGYS (sec. con número de ident.: 97)	ISSSSGYI (sec. con número de ident.: 98)	AREYWGS GFDY (sec. con número de ident.: 99)	QGISYY (sec. con número de ident.: 100)	AEF (sec. con número de ident.: 101)	QKYNTAP RT (sec. con número de ident.: 102)

7.1.1 Diseño de molécula de 05H21A, 15N14A y 08F17A

05H21A, 15N14A y 08F17A son anticuerpos monoclonales (mAb) de inmunoglobulina G1 (IgG1) que se unen a IL-1 β humana. El anticuerpo presenta mutaciones de M252Y, S254T y T256E (YTE, numeración EU) en la región constante para mejorar la interacción con los receptores Fc neonatales (FcRn) a pH ~6, mejorando así el reciclaje endosomal mediado por FcRn, lo que lleva a una exposición sérica más prolongada. (Dall'Acqua et al., J Biol Chem, 2006. 281(33): 23514-241; Dall'Acqua et al., J Immunol, 2002. 169(9): 5171-80). Estos mAb se desarrollaron para dirigir la IL-1 β humana, y bloquear su unión a IL-1R1, e inhibir la señalización de IL-1 β , que es una vía inflamatoria que se ha relacionado con el cáncer (Ridker, P.M. et al., Lancet, 2017. 390(10105): 1833-1842).

7.1.2 Fuente de la secuencia codificante

05H21A, 15N14A y 08F17A se obtuvieron inmunizando ratones transgénicos que poseen un repertorio de anticuerpos humanos (Ablexis®) con ADN recombinante que codifica el hIL-1 β D145K. Estos tres anticuerpos principales se subclonaron en la región constante IgG1-YTE humana y se expresaron de forma recombinante.

7.1.3 Secuencia y estructura

7.1.3.1 Secuencia de aminoácidos de 05H21A, 15N14A y 08F17A

La secuencia de aminoácidos de 05H21A, 15N14A y 08F17A, como se deduce de su secuencia de ADNc, y se confirma mediante el mapeo de péptidos y espectrometría de masas, se muestra en la **Tabla 3**. Las 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR) en cada cadena se muestran en la **Tabla 5** a la **Tabla 9**.

Las secuencias de aminoácidos de VL y VH de 05H21A, 15N14A y 08F17A se muestran en la **Tabla 4**. El residuo glutamina (Q) en la posición 1 de la HC y glutamina (Q) en la posición 1 de la LC constituyen los N-terminales de las cadenas maduras de 05H21A y 15N14A. El residuo de ácido glutámico (E) en la posición 1 de la HC y el ácido aspártico (D) en la posición 1 de la LC constituyen los N-terminales de las cadenas maduras de 08F17A. Las mutaciones de YTE en los dominios constantes de la cadena pesada de 05H21A, 15N14A y 08F17A están en negrita y subrayados en la **Tabla 1**.

7.1.3.2 Evaluación del riesgo de inmunogenicidad *in silico* por

EpiVax EpiMatrix para dominios variables de 05H21A, 15N14A y 08F17A

Las secuencias de regiones variables de mAb se analizaron para determinar la inmunogenicidad potencial usando puntuaciones ajustadas de regulación T (T_{reg}) del programa de predicción de inmunogenicidad *in silico* EpiVax Epimatrix (De Groot et al., Clin Immunol, 2009. 131(2): 189-201). El programa EpiVax Epimatrix calcula el potencial de unión a las moléculas HLA más comunes dentro de cada uno de los “supertipos” o agrupaciones. El informe proporciona resultados que son representativos de >90 % de poblaciones humanas en todo el mundo sin la necesidad de probar cada haplotipo individualmente. La puntuación EpiVax se calcula al agregar las puntuaciones EpiMatrix de todos los epítomos de células T previstos contenidos dentro de una secuencia de proteína dada y al ajustar el contenido de epítomo de células T y la longitud de proteína esperadas. La puntuación de EpiVax e interpretación de EpiVax se muestran a continuación en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Evaluación de inmunogenicidad para 05H21A (anti-hu IL-1 β)

Nombre del Ab	Información de la cadena	Puntuación EpiVax
05H21A	VL de cadena ligera	-61,54
	VH de cadena pesada	-35,07
15N14A	VL de cadena ligera	3,31
	VH de cadena pesada	14,84
08F17A	VL de cadena ligera	-42,83
	VH de cadena pesada	-37,91

7.2 Ejemplo 2: Generación del constructo de expresión de 05H21A, 15N14A y 08F17A

- 5 El ADNc que codifica los anticuerpos 05H21A, 15N14A y 08F17A se sintetizó y subclonó en una columna vertebral del vector de expresión de glutamina sintetasa Leap-In Transposase® en ATUM (CA, Estados Unidos). Los plásmidos de expresión genética dual se transfirieron al Grupo de generación de plásmidos de fabricación de JRD (PA, Estados Unidos) y su secuencia se confirmó en los
- 10 Laboratorios NeoGenomics (CA, Estados Unidos).

La secuencia de nucleótidos de transcripción primaria para los genes de cadena pesada y cadena ligera se enumeran en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Secuencias de nucleótidos de HC y LC de 05H21A, 15N14A y 08F17A

Nombre	Sec. de nucleótido de LC	Sec. de nucleótido de HC
05H21A	CAGTCTGTGCTGACCCAGCCTCC ATCTGTGTCTGAGGCCCTAGAC AGAGAGTGACCATCTCCTGCTCC GGCTCCTCCTCTAACATCGGCGA TAACGCCGTGAACTGGTATCAGC AGCTGCCTGGCAAGGCCCTAA ACTGCTGATCTACAACGACGACC TGCTGTCCTCTGGCGTGTCCGAC AGATTCTCCGGCTCTAAGTCTGG CACCTCCGCCAGCCTGGCTATCT CTGGATTGCAGTCTGAGGACGA GGCCGACTACTACTGTGCCGCCT GGGACGATTCTCTGAACGGCCCT GTTTTTGGCGGAGGCACCAAGCT GACAGTCCTGGGTGAGCCCAAG GCTGCACCCAGTGTCACCTCTGTT CCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTC AAGCCAACAAGGCCCACTGGT GTGTCTCATAAGTGACTTCTACC CGGGAGCCGTGACAGTGGCCTG GAAGGCCGATAGCAGCCCCGTC AAGGCGGGAGTCGAAACCACCA CACCTCCAAACAAAGCAACAAC AAGTACGCGGCCAGCAGCTATCT GAGCCTGACGCCTGAGCAGTGG AAGTCCCACAGAAGCTACAGCTG CCAGGTCACGCATGAAGGGAGC ACCGTGGAGAAGACAGTGGCCC CTACAGAATGTTCA (sec. con núm. de ident.: 103)	CAAGTGACCCTGAGAGAGTCTG GACCCGCTCTGGTCAAGCCCAC ACAGACCCTGACACTGACCTGC ACCTTCTCCGGCTTCTCCCTGT CCACCTCTGGAATGTGGGTGTC CTGGATCAGACAGCCTCCTGGC AAGGCACTGGAATGGCTGGCTC TGATCGATTGGGGCGACGACAA GTACTACACCACCAGCCTGAAA ACCCGGCTGACCATCTCCAAGG ACACCTCCAAGAACCAGGTGGT GCTGACCATGACCAACATGGAC CCTGTGGACACCGCCACCTACT ACTGCGCCAGAATGAGAGAGG GATCCAGAGCCTTCGATATCTG GGGCCAGGGAACCGTGGTCAC CGTTTCTTCTGCCTCCACCAAG GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG CACCTCCTCCAAGAGCACCTC TGGGGGCACAGCGGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTC CCCGAACCGGTGACGGTGTCTG GGAATCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGACACCTTCCCGG CTGTCCTACAGTCCTCAGGACT CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAA CGTGAATCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAAAGTTG AGCCCAAATCTTGTGACAAAAT CACACATGCCACCGTGCCAG CACCTGAACTCCTGGGGGGACC GTCAGTCTTCTTCCCCCA AAACCCAAGGACACCCTCTACA TCACCCGGGAGCCTGAGGTCAC ATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA CAACAGCACGTACCGTGTGGTC AGCGTCCTACCGTCCTGCACC

Nombre	Sec. de nucleótido de LC	Sec. de nucleótido de HC
		AGGACTGGCTGAATGGCAAGGA GTACAAGTGCAAGGTGTCCAAC AAAGCCCTCCCAGCCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCACA GGTGTACACCCTGCCCCCATCC CGGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGG TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGA CATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAATGGGCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACGCCTCCCGTGC TGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCTACAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGATGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCTGCACAA CCACTACACGCAGAAGTCTCTC TCCCTGTCTCCGGGAAAA (sec. con núm. de ident.: 104)
15N14A	CAGGCTGTTCTGACCCAGCCTAG CTCTCTGTCTGCTTCTCCTGGCG CTTCCGCCTCTCTGACCTGCACA CTGAGATCCGGCATCAACGTGG GCACCTACCGGATCTACTGGTAT CAGCAGAAGCCTGGCAGCCCTC CTCAGTACCTGCTGTCCTACAAG TCCGACTCCGACAAGCAGCAAG GCTCTGGCGTGCCCTCTAGATTG TCCGGCTCTAAGGACGCCTCCG CCAATGTGGGCATCCTGCTGATC TCTGGCCTGCAGTCTGAGGACG AGGCCGACTACTACTGCATGATC TGGCACTCCTCCGCCTGGGTTTT CGGAGGCGGAACAAAGCTGACA GTCCTGGGTCAGCCCAAGGCTG CACCCAGTGTCACCTCTGTTCCCG CCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGC CAACAAGGCCACACTGGTGTGTC TCATAAGTGACTTCTACCCGGGA GCCGTGACAGTGGCCTGGAAGG CCGATAGCAGCCCCGTCAAGGC GGGAGTCGAAACCACACACCC	CAGGTTCAGCTGCAAGAGTCTG GACCCGGCCTGGTCAAGCCTTC CGAGACACTGTCTCTGACCTGC ACCGTGTCTGGCGGCTCCATCT CCTCTTACTATTGGACCTGGATC AGACAGCCTGCCGGCAAAGGC CTGGAATGGATCGGCAGAATCG ACTCCTCCGGCTCCTCCAAGTA CAACCCCACTGAAGTCCAGA GTGACCATGTCCGTGGACACCT CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAA GCTGTCCTCCGTGACCGCTGCT GATACCGCCGTGTACTACTGTG CCAGAGGCGACTCTGGATACGA CTGGGCCTTTGACTATTGGGGC CAGGGCACACTGGTCACCGTTT CTTCTGCCTCCACCAAGGGCCC ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC TCCTCCAAGAGCACCTCTGGGG GCACAGCGGCCCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTCCCCGA ACCGGTGACGGTGTGCTGGAAC TCAGGCGCCCTGACCAGCGGC

Nombre	Sec. de nucleótido de LC	Sec. de nucleótido de HC
	TCCAAACAAAGCAACAACAAGTA CGCGGCCAGCAGCTATCTGAGC CTGACGCCTGAGCAGTGGAAGT CCCACAGAAGCTACAGCTGCCA GGTCACGCATGAAGGGAGCACC GTGGAGAAGACAGTGGCCCCTA CAGAATGTTCA (sec. con núm. de ident.: 105)	GTGCACACCTTCCCGGCTGTCC TACAGTCCTCAGGACTCTACTC CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAA TCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCCA AATCTTGTGACAAAACCTCACACA TGCCACCGTGCCCAGCACCTG AACTCCTGGGGGGACCGTCAGT CTTCCTCTTCCCCCCTAAAACCC AAGGACACCCTCTACATCACCC GGGAGCCTGAGGTCACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGA AGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTACAACA GCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCAGGAC TGGCTGAATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAAGC CCTCCCAGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTGTA CACCCTGCCCCCATCCCGGGA GGAGATGACCAAGAACCAGGTC AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG GCTTCTATCCCAGCGACATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAG ACCACGCCTCCCGTGCTGGACT CCGACGGCTCCTTCTTCCTCTA CAGCAAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGATGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACGCAGAAGTCTCTCTCCCTG TCTCCGGGAAAA (sec. con núm. de ident.: 106)
08F17A	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC ATCCTCTCTGTCCGTTCTGTGG GCGACAGAGTGACCATCACCTGT AGAGCCTCTCAGGGCATCTCCTA	GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTG GCGGAGGACTGGTTACCCCTG GCGGATCTCTGAGACTGTCTTG TGCCGCCTCTGGCTTCACCTTC

Nombre	Sec. de nucleótido de LC	Sec. de nucleótido de HC
	CTACCTGGCCTGGTATCAGCAGA AACCCGGCAAGGTGCCCAAGCT GCTGATCTCTGCTGAGTTCACCC TGCAGTCTGGCGTGCCCTCTAGA TTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCAC CGACTTTACCCTGACAATCTCCA GCCTGCAGCCTGAGGATGTGGC CACCTACTACTGCCAGAAGTACA ACACCGCTCCTCGGACCTTTGGC CAGGGCACCAAGGTGGAAATCA AGCGTACTGTGGCTGCACCATCT GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA TGAGCAGTTGAAATCTGGAAGT CCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT AACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA AGTACAGTGGAAGGTGGATAACG CCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG GAGAGTGTACAGAGCAGGACA GCAAGGACAGCACCTACAGCCT CAGCAGCACCTGACGCTGAGC AAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCC ATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGT CACAAAGAGCTTCAACAGGGGA GAGTGT (sec. con núm. de ident.: 107)	TCCGGCTACTCTATGAACTGGG TCCGACAGGCTCCTGGCAAAGG CCTGGAATGGGTGTCCTCCATC TCCTCCAGCAGCGGCTACATCT ACTACGCCGACTCCGTGAAGGG CAGATTACCATCTCCAGAGAC AACGCCAAGAACTCCCTGTACC TGCAGATGAACAGCCTGAGAGC CGAGGACACCGCCGTGTACTAC TGTGCCAGAGAGTATTGGGGCT CCGGCTTCGATTATTGGGGCCA AGGAACACTGGTCACCGTGTCC TCTGCCTCCACCAAGGGCCCAT CGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTC CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGG ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG GTCAAGGACTACTTCCCCGAAC CGGTGACGGTGTCTGTGGAATC AGGCGCCCTGACCAGCGGCGT GCACACCTTCCCGGCTGTCTTA CAGTCCTCAGGACTCTACTCCC TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAATC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGAAAGTTGAGCCCCAA TCTTGTGACAAAACCTCACACATG CCCACCGTGCCCAGCACCTGAA CTCCTGGGGGGGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCAAAACCCAA GGACACCCTCTACATCACCCGG GAGCCTGAGGTACATGCGTGG TGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCA CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT CACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTGTCCAACAAAGCCCT CCCAGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCAAAGCCAAAGGGCAGC CCCGAGAACCACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATCCCGGGAGGA

Nombre	Sec. de nucleótido de LC	Sec. de nucleótido de HC
		GATGACCAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT TCTATCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAACACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGC AGATGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCACTACACG CAGAAGTCTCTCTCCCTGTCTC CGGGAAAA (sec. con núm. de ident.: 108)

Las secuencias de aminoácidos maduros para 05H21A, 15N14A y 08F17A, deducidas de la secuencia de ADNc y confirmadas por mapeo de péptidos y espectrometría de masas, se muestran arriba en la **Tabla 3**.

7.3 Ejemplo 3: Evaluación biofísica de 05H21A, 15N14A y 08F17A

5 7.3.1 Afinidad de unión de 05H21A, 15N14A y 08F17A a IL- β humano mediante SPR

Se realizó la evaluación de afinidad de 05H21A, 15N14A y 08F17A contra IL-1 β humana mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) usando un Biacore 8k. La reactividad cruzada del mismo panel de anticuerpos también se evaluó contra
10 IL-1 β de cyno, ratón, rata y cerdo.

La SPR es una técnica sin etiqueta para estudiar la fuerza de una interacción entre dos componentes de unión al medir el cambio en masa cuando se produce la formación y disociación del complejo. Brevemente, los anticuerpos se inmovilizaron en un chip sensor, que se acopló con Fc antihumano de cabra (chip sensor C1 de GAH-Fc). La
15 IL-1 β soluble fluyó sobre el anticuerpo inmovilizado y se monitorizaron las respuestas de asociación/disociación. La información cinética (constantes de asociación u disociación) se

extraído mediante el ajuste de sensogramas al modelo de Langmuir 1:1. La afinidad de unión (K_D) se informa como la relación de las constantes ($k_{desactivado}/k_{activado}$). Los resultados de las evaluaciones de unión se muestran en la **Tabla 12**.

Los 05 H21A, 15N14A y 08F17A se unen a IL-1 β humana con altas afinidades de ~20 pM, ~64 pM, y ~180 pM, respectivamente. Los 05 H21A, 15N14A y 08F17A también tienen reactividad cruzada a IL-1 β de cyno con afinidades de ~22 pM, ~70 pM y ~1,7 nM. Los tres Abs mostraron una reactividad cruzada nula o débil a la IL-1 β de ratón, rata y cerdo.

Tabla 12. Evaluaciones de unión de 05H21A, 15N14A y 08F17A

Característica de mAb	05H21A	15N14A	08F17A
Afinidad de unión a IL- β humano	K_D (M) = 1,97E-11 k_a (1/Ms) = 2,14E+07 k_d (1/s) = 4,22E-04	K_D (M) = 6,4E-11 k_a (1/Ms) = 2,20E+06 k_d (1/s) = 1,41E-04	K_D (M) = 1,8E-10 k_a (1/Ms) = 8,55E-05 k_d (1/s) = 1,82E-10
Afinidad de unión a IL- β de cyno	K_D (M) = 2,20E-11 M k_a (1/Ms) = 1,58E+07 k_d (1/s) = 3,48E-04	K_D = 7,0E-11 k_a (1/Ms) = 3,01E+06 k_d (1/s) = 2,09E-04	K_D (M) = 1,71E-09 k_a (1/Ms) = 1,72E+05 k_d (1/s) = 2,95E-04
Afinidad de unión a IL- β de ratón	Unión débil K_D >100 nM	Sin unión	Sin unión
Afinidad de unión a IL- β de rata	Unión débil K_D >100 nM	K_D = 7,45E-08 k_a (1/Ms) = 7,71E+05 k_d (1/s) = 5,74E-02	Sin unión
Afinidad de unión a IL- β de cerdo	Sin unión	Sin unión	Sin unión

10 7.3.2 Identificación de epítipo para 05H21A, 15N14A y 08F17A por

HDX

El epítipo en IL-1 β se determinó por espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno-deuterio (HDX-MS). El mapeo de epítipos de anticuerpos

seleccionados sobre IL-1 β usando la LC-MS basada en intercambio de hidrógeno-deuterio se muestra en la **Figura 1**.

Experimento de intercambio para HDX-MS. Se inició la reacción de intercambio mezclando 10 μ l de 10 μ M IL-1 β (R&D Systems), que era los residuos 117-
 5 269 de hIL-1 β (ident. de Uniprot P01584; **sec. con núm. de ident.: 109**), con o sin 1,2 molares de exceso de ligando y 30 μ L de H₂O o un tampón deuterado (20 mM MES, pH 6,4, 150 mM NaCl en D₂O al 95 % o 20 mM Tris, pH 8,4, 150 mM NaCl en D₂O al 95 %). La mezcla de reacción se incubó durante 15, 50, 150, 500 o 1.500 s a 1,2 °C. La solución de intercambio se inactivó mediante la adición de 40 μ L enfriados de
 10 clorhidrato de guanidina 1,6 M, ácido fórmico al 0,8 % y se analizó inmediatamente.

IL-1 β (ident. de Uniprot) (sec. con núm. de ident.: 109):

MAEVPELASEMMAYYSGNEDDLFFFEADGPKQMKCSFQDL DLCPLDGGIQLRI
 SDHHYSKGFRQAASVVVAMDKLRKMLVPCPQTFQENDLSTFFPFIFEEPIFFDTWD
 NEAYVHDAPVRSLNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALHLQGQDMEQQVVFSMSFVQ
 15 GEESNDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEIN
 NKLEFESAQFPNWIYSTSQAENMPVFLGGTKGGQDITDFTMQFVSS

Procedimiento general para la adquisición de datos HDX-MS. La preparación de muestras HDX-MS se realizó con el sistema HDx automatizado (LEAP Technologies, Morrisville, NC). Las columnas y bomba fueron proteasa, proteasa tipo
 20 XIII (proteasa de *Aspergillus saitoi*, tipo XIII)/columna de pepsina (p/p, 1:1; 2,1 x 30 mm) (NovaBioAssays Inc., Woburn, MA); trampa, Precolumna ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard (2,1 x 5 mm) (Waters, Milford, MA), analítica, Accucore C18 (2,1 x 100 mm) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA); y bomba LC, VH-P10-A (Thermo

Fisher Scientific). La bomba de carga (desde la columna de proteasa a la columna trampa) se ajustó a 600 $\mu\text{l}/\text{min}$ con 0,1 % de ácido fórmico acuoso. La bomba de gradiente (desde la columna de trampa a la columna analítica) se ajustó de 9 % a 33 % de acetonitrilo en ácido fórmico acuoso al 0,1 % en 20 min a 100 $\mu\text{l}/\text{min}$.

5 *Adquisición de datos MS.* Los análisis por espectrometría de masas se realizaron usando un espectrómetro de masas LTQ™ Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific) con una temperatura capilar de 275 °C, una resolución de 120.000 y un rango de masa (m/z) de 300 – 1.500.

10 *Extracción de datos DX-MS.* Se usó BioPharma Finder 2.0 (Thermo Fisher Scientific) para la identificación de péptidos de muestras no deuteradas antes de los experimentos HDX. Se usó HDExaminer, versión 2.5 (Sierra Analytics, Modesto, CA) para extraer valores de centroide de los archivos de datos sin procesar de MS para los experimentos HDX.

15 *Análisis de datos HDX-MS.* Los datos HDX-MS extraídos se analizaron adicionalmente en Excel. Todos los puntos de tiempo de intercambio (a pH 6,4 o pH 8,4 a 23 °C) se convirtieron en los puntos de tiempo equivalentes a pH 7,4 y 23 °C (p. ej., 15 s a pH 6,4 a 23 °C es equivalente de 1,5 s a pH 7,4 a 23 °C (**Tabla 13**)).

Tabla 13. Condiciones de reacción HDX y tiempos de intercambio versus tiempos de intercambio corregidos a pH 7,4 y 23 °C.

Tiempo ajustado a pH 7,4, 23 °C (s)	pH 6,4 23 °C (s)	pH 8,4 23 °C (s)
0,15	-----	-----
0,5	-----	-----
1,5	15	-----
5	50	-----

15	150	-----
50	500	-----
150	1500	15
500	-----	50
1500	-----	150
5000	-----	500
15.000	-----	1500

Resultados. Los epítomos fuertes de IL-1 β ($\Delta\Delta G$ tras la unión ≤ -2 kcal/mol) contra 05H21A fueron los residuos 119 (V), 161-162 (SF) y 164-169 (QGEESEN). Los epítomos débiles ($-2 < \Delta\Delta G$ tras la unión ≤ -1 kcal/mol) fueron los
5 residuos 120-123 (RSLN) y 157-160 (VFMSM).

Los epítomos fuertes de IL-1 β contra 08F17A fueron los residuos 147-156 (LQGQDMEQQV) y 264-267 (MQFV).

Los epítomos fuertes de IL-1 β frente a 15N14A fueron los residuos 164-169 (QGEESEN). Los epítomos débiles fueron los residuos 158-162 (FSMSF).

10 **7.3.3 Estabilidad conformacional de 05H21A, 15N14A y 08F17A por DSC**

La estabilidad conformacional de 05H21A, 15N14A y 08F17A se determinó mediante calorimetría de barrido diferencial (DSC, por sus siglas en inglés). El experimento de calorimetría de barrido diferencial se llevó a cabo a 1 mg/ml en acetato de sodio 10 mM
15 pH 5,5 usando el instrumento Microcal VP-DSC Malvern (Northampton, MA, Estados Unidos). Las exploraciones térmicas se realizaron de 25 °C a 95 °C usando una velocidad de escaneo de 60 °C/h con un termostato de preescaneo de 15 minutos. Cada anticuerpo se midió por duplicado con una ejecución de tampón/blanco de tampón entre cada

ejecución de muestra. El análisis de datos se realizó usando el software MicroCal Origin Versión 7 y las temperaturas de transición (Tms) se informaron en la **Tabla 14**.

El termograma 05H21A reveló 3 temperaturas de transición a 62,2 °C (Tm1), 77,9 °C (Tm2) y 84,0 °C (Tm3). El termograma 15N14A reveló 4 temperaturas de transición a 64,7 °C (Tm1), 68,0 °C (Tm2), 76,9 °C (Tm3) y 83,3 °C (Tm4). El termograma 08F17A reveló 3 temperaturas de transición a 62,8 °C (Tm1), 75,5 °C (Tm2) y 83,3 °C (Tm3)

Tabla 14. Temperatura de transición para 05H21A, 15N14A y 08F17A

Característica de mAb	05H21A	15N14A	08F17A	Notas
Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	Tm ₁ = 62,2 °C Tm ₂ = 77,9 °C Tm ₃ = 84,0 °C	Tm ₁ = 63,2 °C Tm ₂ = 68,0 °C Tm ₃ = 76,9 °C Tm ₄ = 83,3 °C	Tm ₁ = 62,8 °C Tm ₂ = 75,5 °C Tm ₃ = 83,3 °C	Medido en acetato de sodio de 10 mM a pH 5,5

10

7.3.4 Hidrofobicidad de 05H21A, 15N14A y 08F17A por aHIC

La hidrofobicidad relativa de 05H21A, 15N14A y 08F17A se evaluó mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, por sus siglas en inglés). Brevemente, las muestras se diluyeron 1:5 en un regulador de alta salinidad (100 mM fosfato de sodio, 1,5 M (NH₄)₂SO₄, pH 6,5) y aproximadamente 10 ugs de cada muestra se inyectaron en una columna TOSOH TSKgel butil-NPR en un instrumento Agilent HPLC. La HIC se ejecutó bajo un gradiente lineal de amoniaco-SO₄ de 1,1 M-0 M durante 8 minutos. Se recolectaron señales de UV280 y fluorescencia (excitación a 280 nm y emisión a 340 nm). La hidrofobicidad relativa se evaluó como tiempo de retención en relación con el estándar hidrofóbico interno (CNT0607) y se informó

20

como un índice de hidrofobicidad ($HI = rtAb/rtCNTO607$). Los tiempos de retención y el índice de hidrofobicidad de los anticuerpos IL-1 β se muestran en la **Tabla 15**.

La hidrofobicidad relativa fue baja para 05H21A y 15N14A (HI 0,37 y 0,49, respectivamente) pero moderada para 08F17A (HI 0,80).

5 **Tabla 15.** Hidrofobicidad relativa por una HIC

Característica de mAb	05H21A	15N14A	08F17A	CNTO607
Hidrofobicidad relativa (HICa)	Baja hidrofobicidad superficial: $HI = 0,37$ $TA = 1,74$ min	Baja hidrofobicidad superficial: $HI = 0,49$ $TA = 2,32$ min.	Moderada hidrofobicidad superficial: $HI = 0,80$ $TA = 3,77$	Moderada hidrofobicidad superficial: $HI = 1$ $TA = 4,72$ min

7.4 Ejemplo 4: Producción y purificación de proteínas

7.4.1 Preparación de 05H21A, 15N14A y 08F17A

Los 05H21A, 15N14A y 08F17A se expresaron en células CHO
10 transfectadas de manera estable y se purificaron usando cromatografía en columna.

7.4.2 Expresión de proteínas y cultivo celular

Los 05 H21A, 15N14A y 08F17A se expresaron en un grupo anticlonal
Horizon CHO transfectado de manera estable que se generó por electroporación con
ADN plasmídico purificado que codifica 05H21A, 15N14A o 08F17A (cadena pesada y
15 cadena ligera) y ARNm de transposasa de Leap-In (ATUM, cat. núm. LPN-1R)
usando un electroporador MaxCyte STx. Después de la electroporación, se siguieron
los protocolos de expresión estándar para la generación de lotes alimentados. Cada
lote alimentado se cosechó y se clarificó por centrifugación seguida de filtración.

7.4.3 Purificación de proteína

Los sobrenadantes de cultivo celular filtrados se purificaron usando protocolos de purificación estándar. Brevemente, cada sobrenadante se cargó en una columna de proteína A preequilibrada (GE Healthcare) usando un sistema de cromatografía AKTA. Después de la carga, la columna se lavó con 7 volúmenes de columna de 1×DPBS, pH 7,2. La proteína se eluyó con 2,5 volúmenes de columna de acetato de sodio 0,1 M, pH 3,5. Las fracciones de proteínas se neutralizaron inmediatamente mediante la adición de 2,5 M de Tris HCl, pH 7,5 a 8 % (v/v) del volumen de la fracción de elución y se agruparon fracciones pico.

La mezcla de elución post-ProA se purificó adicionalmente mediante cromatografía de intercambio catiónico (CEX) usando resina de impacto Capto S (GE Healthcare). La proteína se eluyó de la columna con un gradiente de NaCl creciente en 20 mM MES, pH 6,5. Solo se agruparon las fracciones de picos que contenían proteína monomérica. La mezcla de elución post-CEX se dializó en acetato de sodio 10 mM, pH 5,5 usando un casete de diálisis Pierce (ThermoFisher) y después se filtró (0,2 µm).

7.4.4 Control de calidad

La concentración de proteína purificada se determinó por absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Dropsense usando el coeficiente de extinción calculado (**Tabla 16**). La calidad de la proteína purificada se evaluó por SDS-PAGE y HPLC de exclusión por tamaño analítico (sistema Agilent HPLC). El nivel de endotoxina se midió usando un ensayo turbidométrico de LAL (Pyrotell®-T, Associates of Cape Cod; Falmouth, MA). El sumario de los datos de control de calidad se encuentra en la **Tabla 16**.

Tabla 16: Sumario de datos de liberación de proteínas

Núm. de ident. de lote de GDB	Descripción de la proteína	Concentración (mg/ml)	Volumen (ml)	Rendimiento total (mg)	% de monómero (SE-HPLC)	Endotoxina (Eu/mg)	Masa medida G0F/G0F [Da]	Error [ppm]	Regulador
05H21A	05H21A (anti-IL-1 β) mAb [IgG1: YTE]	19,33	109	2107	>99	<1	147.216,4	51,8	Acetato de sodio, 10 mM, pH 5,5
15N14A	15N14A (anti-IL-1 β) mAb [IgG1: YTE]	15,06	79,0	1190	97,1	<1	147.842,9	39,0	Acetato, 10 mM, pH5,5
08F17A	08F17A (anti-IL-1 β) mAb [IgG1: YTE]	18,12	58,9	1067	97,3	<1	147.368,5	26,3	Acetato, 10 mM, pH5,5

7.5 Ejemplo 5: Ensayos funcionales para anticuerpos anti-IL-1 β

7.5.1 Métodos experimentales

5 7.5.1.1 Inhibición de la señalización de IL-1 β en la línea reportera

HEK-Blue IL-1 β

Se recolectaron las células HEK-Blue IL-1 β (cultivadas en DMEM con 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS, por sus siglas en inglés), 1 % de penicilina/estreptomicina y 100 μ g/ml de normocina) y se lavaron dos veces en PBS.

10 Las células se resuspendieron en medio a una concentración de 330.000 células/ml y se sembraron en placa 150 μ l por pocillo de acuerdo con el diseño de la placa. El recuento de células finales es de 50.000 por pocillo.

Los anticuerpos de ensayo se diluyeron a una concentración inicial de 40 nM (concentración final de 5 nM) y se probaron diluyendo en serie tres veces en
15 medio. El IL-1 β humano recombinante (rhIL-1 β) se diluyó a 0,8 ng/ml (concentración final de 0,1 ng/ml o 6 pM) en medio. 100 μ l de IL-1 β humano recombinante (rhIL-1 β) y

anticuerpos anti-IL-1 β principales se coincubaron durante 30 minutos a 37 °C en 5 % de CO₂. 50 μ l de complejo de anticuerpo/rhIL-1 β se añadió después a las células y se establecieron réplicas biológicas. El complejo después se encubó con las células durante 18-20 horas a 37 °C con 5 % de CO₂. Después de la incubación, se preparó la solución QuantiBlue y se añadieron 180 μ l a una placa no fijada de 96 pocillos. Se añadió 20 μ l de cada pocillo celular a la solución QuantiBlue y se incubó durante 30 minutos a 37 °C con 5 % de CO₂. Después, se leyeron las placas a una densidad óptica de 655 nm y se calcularon las concentraciones inhibitorias medias máximas (IC₅₀) del anticuerpo principal anti-IL-1 β usando la función log (inhibidor) vs. respuesta (pendiente variable) en GraphPad.

7.5.1.2 Inhibición de la producción de IL-6 inducida por IL-1 β en células MRC5

La producción de IL-6 en fibroblastos pulmonares MRC5 se evaluó como se describió previamente (Goh AX *et al*, MAb. 2014;6(3):765-773). Las células de fibroblastos MRC5 [ATCC, núm. CCL-171] (cultivadas en EMEM con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS) y 1 % de penicilina/estreptomicina) se tripsinizaron y se contaron. Las células se resuspendieron en medio a una concentración de 30.000 células/ml y se sembraron en placas con 3000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos. Se permitió que las células se recuperaran durante 16 h durante la noche a 37 °C/CO₂ al 5 %. Los anticuerpos de ensayo se diluyeron a una concentración inicial de 10 nM y se diluyeron en serie por duplicado (en medio completo) en una placa de 96 pocillos usando tres pasos. Se transfirieron 100 μ l de cada dilución de anticuerpo a una placa nueva de 96 pocillos. La proteína IL-1 β recombinante se diluyó a 110 pg/ml en medio

y se añadieron 11 μ l a cada pocillo de anticuerpo (concentración final de IL-1 β de 11 pg/ml; esta concentración se determinó previamente como la CE50 para 3000 células a las 4 h usando liberación de IL-6 como lectura). Se coincubaron diluciones seriadas de rhIL-1 β y anticuerpo anti-IL-1 β durante 30 minutos a 37 °C con 5 % de CO₂. Después, se añadieron
5 100 μ l de complejo coincubado a las células según el diseño de la placa. Las células se incubaron durante 4 horas a 37 °C con 5 % de CO₂. Después, se extrajeron 80 μ l de medio y se transfirieron a una placa nueva de 96 pocillos y se congelaron a -80 °C.

Las muestras de medios se descongelaron en hielo y se evaluaron mediante ELISA. Las placas ELISA de alta unión se prepararon agregando
10 anticuerpos de captura a cada pocillo e incubando durante la noche según el protocolo del producto (kit R&D IL-6 Duoset ELISA; Cat. núm. DY206-05). Se evaluaron 50 μ l de medios celulares recolectados con este kit, y todos los pasos siguieron el protocolo del fabricante. El kit proporcionó hIL-6 recombinante como control positivo. El ELISA se desarrolló usando SureBlue TMB (KPL; núm. 52-00-03)
15 durante 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo (solución de detención de TMB) y se midieron las absorbancias a 450 nm y 540 nm. El análisis se realizó en GraphPad Prism. Para cada pocillo, se restó OD₅₄₀ de OD₄₅₀ para normalizar las imperfecciones ópticas de cada pocillo. La fila inferior de cada placa (solo diluyente) se promedió y restó de cada muestra para tener en cuenta el fondo
20 de la placa. La curva estándar de IL-6 se usó para calcular la IL-6 en cada muestra. La IC₅₀ para cada anticuerpo se determinó mediante un análisis de pendiente variable de cuatro parámetros (log(agonista) frente a respuesta) en GraphPad.

7.5.1.3 Inhibición de la producción de IL-6, ENA-78 (CXCL5) y G-CSF inducida por IL-1 β en NHDF

Los fibroblastos dérmicos humanos donantes (Lonza, cat. CC-2509; donantes 29073 y 29114) se diluyeron a 5000 células/ml (1000 células/pocillo finales en medio FGM-2) y se añadieron 200 μ l a cada pocillo de placas de fondo plano de 96 pocillos y se incubaron durante la noche a 37 °C, con 5 % de CO₂. Los anticuerpos de ensayo se prepararon con una titulación de dosis de 3 veces de anticuerpos 4X con concentraciones finales de 10 nM-0,001 nM en FGM-2.

Se preparó un 4X rhIL-1 β (concentración de ensayo final 10 pM de rhIL-1 β) añadiendo 41,4 μ l de una dilución 1:1000 de rhIL-1 β + 49,959 ml de FGM-2. Se combinaron 200 μ l de la titulación de anticuerpos 4X y 200 μ l de rhIL-1 β 4X y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Los fibroblastos en placa se lavaron con 200 μ l de medio FBM. Se eliminó el exceso de FBM sacudiendo las placas y se añadieron 100 μ l de medio FGM-2 por pocillo. Después, se añadieron 100 μ l de la mezcla 2X de anticuerpo/rhIL-1 β y las placas se incubaron a 37 °C, con 5 % de CO₂ durante 18-20 horas. Se eliminó un total de 125 μ l de sobrenadante y se transfirió a una nueva placa de fondo redondo de 96 pocillos y se almacenó a -20 °C para la lectura de MSD aguas abajo.

MSD U-Plex (Lonza, cat. núm. K15067L-4) se usó para cuantificar IL-6, ENA-78 (CXCL5) y G-CSF en sobrenadantes de ensayo. La cuantificación se realizó de acuerdo con el protocolo alternativo del fabricante, que añade anticuerpos de detección directamente a la muestra sin lavado intermedio. Los ajustes de la curva estándar se generaron en Workbench usando el ajuste de la curva de regresión lineal 4P con una ponderación de $1/(SD)^2$ y el porcentaje de inhibición (IC₅₀) se calculó

usando el ajuste de la curva de regresión lineal 4P de GraphPad PRISM sin ponderación [porcentaje de inhibición = $100 \times (\text{contr. pos.} - \text{contr. neg.}) - (\text{muestra} - \text{contr. neg.}) / (\text{contr. pos.} - \text{contr. neg.})$]. Para cualquier punto de datos por debajo del LLOD (Límite inferior de detección), se sustituyó el valor del LLOD para el analito calculado a partir de la curva estándar. Para cualquier punto de datos por encima del ULOD (Límite superior de detección), se excluyó el valor.

7.5.1.4 Inhibición de la producción de IL-6, ENA-78 (CXCL5) y G-CSF inducida por IL-1 β en NHLF

Los fibroblastos pulmonares humanos donantes (Lonza, cat. CC-2512; donantes 34325 and 35234) se diluyeron a 10000 células/ml (2000 células/pocillo finales en medio FGM-2) y se añadieron 200 μ l a cada pocillo de placas de fondo plano de 96 pocillos y se incubaron durante la noche a 37 °C, con 5 % de CO₂. Los anticuerpos de ensayo se prepararon a una titulación de dosis de 3 veces de anticuerpos 4 x con concentraciones finales de 10 nM-0,001 nM en FGM-2 (ident. de anticuerpo de ensayo y concentraciones de lote enumeradas en la tabla a continuación).

Se preparó una rhIL-1 β 4X (concentración de ensayo final de rhIL-1 β 10 pM) añadiendo 24,8 μ l de una dilución 1:1000 de rhIL-1 β + 29,975 ml de FGM-2. Se combinaron 350 μ l de la titulación de anticuerpos 4X y 350 μ l de 4X rhIL-1 β y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Los fibroblastos en placa se lavaron con 200 μ l de medio FBM. Se eliminó el exceso de FBM sacudiendo las placas y se añadieron 100 μ l de medio FGM-2 por pocillo. Después, se añadieron 100 μ l de la mezcla 2X de anticuerpo/rhIL-1 β y las placas se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 18-20 horas. Se

eliminó un total de 125 µl de sobrenadante y se transfirió a una nueva placa de fondo redondo de 96 pocillos y se almacenó a -20 °C para la lectura de MSD aguas abajo.

MSD U-Plex (Lonza, cat. núm. K15067L-4) se usó para cuantificar IL-6, ENA-78 (CXCL5) y G-CSF de acuerdo con el protocolo alternativo del fabricante, que
 5 añade anticuerpos de detección directamente a la muestra sin lavado intermedio. Los ajustes de la curva estándar se generaron en Workbench usando el ajuste de la curva de regresión lineal 4P con una ponderación de $1/(SD)^2$ y el porcentaje de inhibición (IC50) se calculó usando el ajuste de la curva de regresión lineal 4P de GraphPad PRISM sin ponderación [porcentaje de inhibición = $100 * (\text{contr. pos.} - \text{contr. neg.}) -$
 10 $(\text{muestra} - \text{contr. neg.}) / (\text{contr. pos.} - \text{contr. neg.})$]. Para cualquier punto de datos por debajo del LLOD (Límite inferior de detección), se sustituyó el valor del LLOD para el analito calculado a partir de la curva estándar. Para cualquier punto de datos por encima del ULOD (Límite superior de detección), se excluyó el valor.

7.5.1.5 Determinación de la curva de inducción de IL-1β en PBMC

15 humanas

El tratamiento de PBMC (células mononucleares de sangre periférica) con rhIL-1β induce la liberación de IL-6 en el sobrenadante. Se probó una titulación de IL-1β contra PBMC humanas para determinar y establecer los valores EC50 y EC90 para la evaluación posterior de los anticuerpos de ensayo.

20 Se obtuvo sangre de donantes sanos y las PBMC se aislaron mediante Ficoll-Hypaque usando métodos estándar y se congelaron hasta su uso. Las PBMC se descongelaron en RPMI completo precalentado (RPMI que contenía 10 % de inactivado por calor (HI), 1 % de penicilina, 1 % de estreptomicina y 1 % de

glutamina) y se lavaron dos veces. Las células se contaron y se resuspendieron a 1 millón por ml. Se añadieron 100 µl de células a una placa tratada con TC de fondo plano. La rhIL-1β (201-LB/CF, R&D Systems) se diluyó en serie a partir de una concentración 3 veces mayor que la concentración inicial deseada y se realizaron diluciones en serie. Se añadieron 50 µl de dilución por duplicado o triplicado a las células y las placas se incubaron 18-20 horas a 37 °C con 5 % de CO₂.

La IL-6 se midió en el sobrenadante usando un kit ELISA de IL-6 humana (DY206, R&D Systems, adaptado a placas ELISA de media área, Corning 3690). Se analizaron 50 µl de sobrenadante de cada réplica biológica por pozo y se realizó el ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos se representaron y analizaron usando Graphpad Prism y/o los valores modelados fueron determinados por un bioestadístico.

Tabla 17. Valores modelados de inducción de IL-1β de EC50 y EC90 entre donantes probados

Donante	EC50	EC90
AC5684	4,419 (3,231, 6,042)	12,445 (8,443, 18,344)
TS078.5	18,673 (13,656, 25,532)	71,474 (48,49, 105,351)
TS083	17,935 (13,117, 24,524)	69,250 (46,982, 102,073)
TS235	8,335 (6,096, 11,397)	29,074 (19,725, 42,855)
TS274	9,418 (6,888, 12,877)	22,148 (15,026, 32,645)
TS294	11,762 (8,602, 16,082)	43,364 (29,42, 63,918)
TS301	7,347 (5,373, 10,046)	25,794 (17,5, 38,02)
TS319	6,056 (4,429, 8,281)	26,520 (17,992, 39,09)
TS320	8,472 (6,196, 11,584)	34,077 (23,119, 50,229)
Modelo	9,289 (6,794, 12,702)	32,468 (22,028, 47,857)
Mediana	8,472	29,074
Media	10,268	37,127
Rango de donantes	[4,419, 18,673]	[12,445, 71,474]

7.5.1.6 Inhibición de la producción de IL-6 inducida por IL-1 β - en PBMC humanas

Los anticuerpos de ensayo se analizaron frente a una concentración de rhIL-1 β de 10 pM o 30 pM (como se determina en la sección 7.5.1.5) y la producción de IL-6 se cuantificó mediante ELISA en PBMC humanas.

Los anticuerpos de ensayo se prepararon a una concentración 3X (5 nM) y se diluyeron 3 veces en serie y se mezclaron con un volumen igual de rhIL-1 β a las concentraciones predeterminadas de 10 pM (~EC50) y 30 pM (~EC90). Después de una incubación de 60 minutos a 37 °C con 5 % de CO₂, se añadieron 100 μ l de cada mezcla a una placa tratada con TC de fondo plano. Los controles incluyeron medios solos para establecer la respuesta inicial, rhIL-1 β (para medir la respuesta máxima) y anticuerpos solos para garantizar que no hubiera inducción de IL-6 por parte de los anticuerpos solos. Durante este período de incubación, se prepararon PBMC humanas como antes y se llevaron a una concentración de 2 millones por ml y se añadieron 50 μ l a cada pocillo. Las células se incubaron durante 18-20 horas a 37 °C con 5 % de CO₂. IL-6 (cat. DY206, R&D Systems, adaptado a placas ELISA de media área, Corning3690) se midió utilizando 50 μ l de sobrenadante por pocillo. Los datos se graficaron y analizaron utilizando GraphPad Prism para determinar las IC₅₀.

7.5.1.7 Inhibición de la producción de IL-6, ENA-78 (CXCL5) y G-CSF inducida por IL-1 β en ensayos de sangre entera humana

La sangre entera humana del donante se recolectó en tubos ACD y se envió al sitio de prueba para su uso inmediato. Los anticuerpos anti-IL-1 β de ensayo se diluyeron en serie a una concentración de 10X en placas con fondo en U de 96 pocillos

en PBS que contenía BSA al 1 %, con la concentración final superior a 10 nM y el control “sin anticuerpo” incluido en la serie de dilución. Se preparó rhIL-1 β (R&D Systems) a 1000 pM en PBS que contenía BSA al 1 % y se usó una concentración de ensayo final de 100 pM. Se combinaron diluciones de anticuerpo 10X y diluciones de rhIL-1 β 10X a 1:1 y se incubaron a temperatura ambiente durante 60 min. Las muestras de sangre de donantes humanos se mezclaron suavemente y se sembraron 80 μ l de sangre entera por pocillo en placas de cultivo de tejido con fondo en U de 96 pocillos. Se añadieron 20 μ l de mezcla de anticuerpo + rhIL-1 β por pocillo y se añadió 1 % de PBS/BSA a los pocillos de control sin rhIL-1 β y/o anticuerpo. También, se preparó una serie de diluciones de rhIL-1 β para confirmar la respuesta a la dosis de IL-1 β en muestras de pacientes. Después, las células tratadas se incubaron durante 22 ± 2 horas a 37 °C. Después de la incubación durante la noche, se añadieron 100 μ l de PBS a todos los pocillos, se mezclaron y se centrifugaron en placas de ensayo de 96 pocillos a 300xG durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se transfirieron 100 μ l de sobrenadante a una nueva placa de 96 pocillos y se usaron 25 μ l de sobrenadante de ensayo directamente en el ensayo MSD y se llevó a cabo el análisis de IL-6, G-CSF y CXCL5 (ENA-78) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con las siguientes excepciones: (i) se duplicó la concentración del calibrador núm. 1 (IL-6) diluyendo 2 viales en 125 μ l cada uno y combinándolos, y (ii) se realizó una curva estándar de 11 puntos (dilución de 4 veces según las instrucciones) + blanco para 12 puntos en total. Las incógnitas se calcularon en el software MSD Workbench y se usó el prisma GraphPad para calcular los valores de EC (estimulación con rhIL-1 β) y los valores de IC (inhibición de anticuerpos) usando el ajuste de la curva de regresión lineal 4P.

7.5.1.8 Establecimiento de la relevancia de las especies: Inhibición de la producción de IL-6 y G-CSF inducida por IL-1 β en fibroblastos dérmicos y pulmonares de cynomolgus

Se diluyeron fibroblastos dérmicos y pulmonares de cynomolgus a 15000
 5 células/ml (3000 células finales/pocillo) en medio CFM (Complete Fibroblast Media, Cell
 Biologics, cat. núm. M32267) y se añadieron 200 μ l a los pocillos individuales de placas
 de fondo plano de 96 pocillos. La placa se incubó a 37 °C, CO₂ al 5 % durante la noche.
 Se preparó una titulación de dosis triple de anticuerpo de ensayo 4X con
 concentraciones finales de 10 nM - 0,001 nM excepto para 08F17A, que tenía un rango
 10 de dosis de 100 nM - 0,01 nM en CFM. Se preparó una rcyno-IL-1 β 4X (concentración de
 ensayo final de rcyno-IL-1 β de 5 pM y 15 pM para fibroblastos cinodérmicos y
 fibroblastos cinopulmonares, respectivamente) en CFM y se combinaron 200 μ l de
 rcynoIL-1 β 4X con 200 μ l de titulación de anticuerpos de ensayo 4X, seguida de
 incubación a temperatura ambiente durante 1 h. Los fibroblastos dérmicos y pulmonares
 15 en placa se lavaron con 200 μ l de medio FBM y se añadieron 100 μ l de medio CFM por
 pocillo. Después, se añadieron 100 μ l de la mezcla 2X de anticuerpo/rcynoIL-1 β al pocillo
 de prueba correspondiente y se incubó a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 18-20 horas. Se
 eliminó un total de 125 μ l de sobrenadante y se transfirió a una nueva placa de fondo
 redondo de 96 pocillos y se almacenó a -20 °C para la lectura de MSD aguas abajo.

20 MSD U-Plex (Lonza, cat. núm. K15067L-4) se usó para cuantificar IL-6 y G-
 CSF de acuerdo con el protocolo alternativo del fabricante, que añade anticuerpos de
 detección directamente a la muestra sin lavado intermedio. Los ajustes de la curva
 estándar se generaron en Workbench usando el ajuste de la curva de regresión lineal

4P con una ponderación de $1/(SD)^2$ y el porcentaje de inhibición (IC50) se calculó usando el ajuste de la curva de regresión lineal 4P de GraphPad PRISM sin ponderación [porcentaje de inhibición = $100 * (\text{contr. pos.} - \text{contr. neg.}) - (\text{muestra} - \text{contr. neg.}) / (\text{contr. pos.} - \text{contr. neg.})$]. Para cualquier punto de datos por debajo del LLOD (Límite inferior de detección), se substituyó el valor del LLOD para el analito calculado a partir de la curva estándar. Para cualquier punto de datos por encima del ULOD (Límite superior de detección), se excluyó el valor.

RESULTADOS

7.5.2 Los mAb anti-IL-1 β inhiben la señalización de IL-1 en una línea celular reportera

La capacidad del panel principal anti-IL-1 β para inhibir la vía de IL-1 se evaluó en la línea celular reportera HEK-Blue™ IL-1 β (Invivogen). Esta línea celular reportera ha sido diseñada a partir de células HEK 293 de riñón embrionario humano para detectar IL-1 β bioactiva mediante la activación de un reportero de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP, por sus siglas en inglés) inducible por NF- κ B y AP-1. La línea celular responde tanto a la IL-1 β humana como a la IL-1 α , ya que emiten señales a través del mismo receptor, IL-1RI. Además, los genes que codifican TNFR1, TLR3 y TLR5, que emiten señales a través de las vías NF- κ B y AP-1, se han eliminado en esta línea indicadora para evitar interferencias. En este estudio, se evaluaron 05H21A, 15N14A y 08F17A para determinar la actividad neutralizante del gen indicador. Todos los mAb exhibieron una inhibición dependiente de la dosis (**Figura 2**). Los valores de IC50 de todos los mAb principales se muestran en la **Figura 2**.

7.5.3 Los mAb anti-IL-1 β inhiben la producción de IL-6 inducida por IL-1 β en una línea celular de fibroblastos pulmonares

Para evaluar aún más la actividad neutralizante de los mAb principales anti-IL-1 β , se estableció un ensayo basado en la liberación de IL-6 en fibroblastos

5 pulmonares MRC5. La IL-6 es una citocina inflamatoria pleiotrópica que está regulada principalmente por la vía de IL-1 a través de la activación de NF- κ B y AP-1. Como tal, la actividad de IL-1 β se puede medir fácilmente a través de la producción de IL-6 tras la exposición de células MRC5 a rhIL-1 β . 15N14A, 08F17A y 05H21A inhibieron la liberación de IL-6 de manera dependiente de la dosis (**Figura 3**). Los valores de
10 potencia IC50 para los tres mAb probados se informan en la **Figura. 3**.

7.5.4 Los mAb anti-IL-1 β inhiben IL-1 la bioactividad de IL-1 β en fibroblastos humanos primarios

La actividad inhibidora de 05H21A, 15N14A y 08F17A se evaluó en fibroblastos pulmonares humanos primarios (donantes núm. 34325 y núm. 35234).

15 Como medida de la actividad de la vía de IL-1 β , se cuantificó la producción y secreción de citocinas IL-6, ENA-78 (CXCL5) y G-CSF a partir de sobrenadantes de cultivo mediante MSD. Se usó una cantidad final de 10 pM de rhIL-1 β para asegurar una activación completa de la vía de IL-1 en estas muestras de donantes. Todos los mAb de prueba exhibieron una actividad neutralizante dependiente de la
20 concentración, que se basó en las mediciones de liberación de IL-6 y CXCL5 (ENA-78) (**Figura 4**, parte A y parte B, respectivamente). Los valores de potencia IC50 para los tres mAb probados se capturan en la **Figura 4**. La evaluación en fibroblastos humanos dérmicos primarios (donante núm. 29114) mostró potencias similares a las

de las muestras de fibroblastos pulmonares humanos, con valores IC30, IC50 y IC90 modelados informados en la **Tabla 18** en comparación con los valores IC30, IC50 e IC90 modelados determinados en muestras de fibroblastos pulmonares humanos.

Tabla 18. Valores inhibidores para el panel de anticuerpos principales de IL-1 β en

5 fibroblastos dérmicos y pulmonares humanos

Tipo celular	Compuesto	Donantes	IC30 (95 % de CI)	IC50 (95 % de CI)	IC90 (95 % de CI)
NHLF	05H21A	34325	0,071 (0,046, 0,11)	0,167 (0,11, 0,254)	1,510 (0,893, 2,555)
		35234	0,042 (0,027, 0,065)	0,098 (0,065, 0,149)	0,890 (0,526, 1,505)
	15N14A	34325	0,128 (0,095, 0,173)	0,253 (0,189, 0,339)	1,479 (1, 2,186)
		35234	0,090 (0,067, 0,122)	0,178 (0,133, 0,239)	1,043 (0,705, 1,542)
	08F17A	34325	0,127 (0,093, 0,175)	0,293 (0,216, 0,398)	2,552 (1,613, 4,038)
		35234	0,090 (0,065, 0,123)	0,207 (0,152, 0,281)	1,803 (1,139, 2,852)
NHDF	05H21A	29114	0,039 (0,030, 0,050)	0,078 (0,065, 0,095)	0,490 (0,323, 0,743)
	15N14A		0,069 (0,049, 0,095)	0,127 (0,098, 0,165)	0,626 (0,349, 1,123)
	08F17A		0,087 (0,061, 0,124)	0,174 (0,130, 0,234)	1,073 (0,541, 2,129)

Los valores IC30, IC50 y IC90 modelados en fibroblastos dérmicos humanos (donante NHDF núm. 29114) y fibroblastos pulmonares humanos (donantes NHLF núm. 34325 y núm. 35234) se informan en nM y el CI indica el intervalo de confianza.

7.5.5 Los mAb anti-IL-1 β inhiben la bioactividad de IL-1 β en

10 **muestras de PBMC de donantes humanos**

Los experimentos de inducción que usan rhIL-1 β se realizaron en un panel de donantes de PBMC humanos sanos. Las estimaciones de inducción de EC50 y EC90 modeladas se determinaron en base a las mediciones de liberación de citoquinas IL-6 inducidas por rhIL-1 β usando un modelo de efectos mixtos no lineales (**Tabla 17**).

15 Los valores de inducción de EC50 de rhIL-1 β entre los donantes variaron de 4,42 a 18,67 pM con un valor medio de 8,4 pM; y los valores de EC90 de rhIL-1 β variaron de 12,45 a 71,47 pM con un valor medio de 29,1 pM. A partir de estos estudios, se

seleccionaron 10 pM y 30 pM de rhIL-1 β como valores representativos de EC50 y EC90 para usar en estudios de potencia posteriores en ensayos de PBMC de donantes.

Después, se evaluó la actividad funcional de los mAb anti-IL-1 β , 15N14A, 05H21A y 08F17A, en un panel de cinco donantes de PBMC usando las dos concentraciones de inducción de rhIL-1 β predeterminadas. Todos los mAb anti-IL-1 β exhibieron una inhibición dependiente de la dosis, como se muestra en una muestra representativa de PBMC de un donante (**Figura 5**). Las medias estimadas de IC30, IC50 y IC90 modeladas (n=5 PBMC de donantes) se informan en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Valores inhibitorios para el panel de anticuerpos principales de IL-1 β en muestras de PBMC humanas

Tratamiento	IC	05H21A	08F17A	15N14A
10 pM IL1 β	30	0,043 (0,028, 0,067)	0,052 (0,034, 0,082)	0,032 (0,018, 0,059)
	50	0,070 (0,045, 0,107)	0,092 (0,060, 0,142)	0,056 (0,031, 0,099)
	90	0,244 (0,146, 0,407)	0,402 (0,212, 0,765)	0,226 (0,108, 0,474)
30pM IL1 β	30	0,104 (0,075, 0,144)	0,156 (0,115, 0,212)	0,075 (0,056, 0,099)
	50	0,164 (0,120, 0,223)	0,241 (0,178, 0,328)	0,120 (0,092, 0,155)
	90	0,533 (0,294, 0,969)	0,744 (0,487, 1,136)	0,409 (0,228, 0,734)

*Medias estimadas de IC30, IC50 e IC90 modeladas basadas en el análisis de dosis-respuesta del porcentaje de inhibición de un ensayo de liberación de IL-6 representativo realizado en cinco muestras de donantes de PBMC. Los valores se informan en nM.

7.5.6 Los mAb de anti-IL-1 β inhiben la bioactividad de IL-1 β en

muestras de sangre entera humana

Como medida final de potencia, se evaluó la actividad neutralizante del panel de mAb de anti-IL-1 β en muestras de donantes de sangre entera humana. La evaluación de la potencia en muestras de sangre entera proporciona un entorno fisiológicamente más relevante en comparación con la evaluación en muestras de PBMC dada la presencia de proteínas séricas. La potencia de 15N14A, 08F17A y

05H21A se evaluó en 5 muestras de donantes y se basó en medidas de liberación de citoquinas IL-6, CXCL-5 y G-CSF (**Figura 6**). Las medias estimadas de IC30, IC50 e IC90 modeladas de 5 muestras de donantes de sangre se basaron en el análisis de dosis-respuesta del porcentaje de inhibición y se informan en la **Tabla 20**.

- 5 **Tabla 20.** Valores inhibidores para el panel de anticuerpos principal de IL-1 β en ensayo de sangre entera humana

Citocina	Compuesto	IC30 (95 % de CI)	IC50 (95 % de CI)	IC90 (95 % de CI)
IL-6	15N14A	0,360 (0,263, 0,493)	0,595 (0,450, 0,786)	2,183 (1,200, 3,974)
	05H21A	0,393 (0,280, 0,552)	0,631 (0,465, 0,857)	2,156 (1,064, 4,368)
	08F17A	0,872 (0,513, 1,483)	1,529 (0,853, 2,743)	6,559 (1,895, 22,703)
G-CSF	15N14A	0,299 (0,183, 0,488)	0,520 (0,329, 0,820)	2,179 (0,813, 5,840)
	05H21A	0,364 (0,221, 0,600)	0,632 (0,394, 1,016)	2,643 (1,026, 6,807)
	08F17A	0,704 (0,398, 1,246)	1,311 (0,683, 2,516)	6,576 (1,549, 27,909)
CXCL5	15N14A	0,364 (0,244, 0,542)	0,603 (0,420, 0,867)	2,236 (0,981, 5,098)
	05H21A	0,400 (0,249, 0,642)	0,622 (0,403, 0,961)	1,953 (0,757, 5,035)
	08F17A	1,330 (0,437, 4,049)	2,859 (0,646, 12,642)	20,797 (0,860, 502,943)

* Medias estimadas de IC30, IC50 e IC90 modeladas basadas en el análisis de dosis-respuesta del porcentaje de inhibición de un ensayo de liberación de IL-6, CXCL5 y G-CSF representativo realizado en cinco muestras de sangre humana sana (donantes CC00448, M3767, M5988, M7286 y M7370). Los datos se informan en nM y el CI indica el intervalo de confianza.

10

7.5.7 Relevancia en NHP: Los mAb de anti-IL-1 β inhiben la

bioactividad de IL-1 β en fibroblastos de mono cynomolgus

Para permitir los estudios de toxicología en primates, se evaluó la reactividad cruzada de 15N14A, 08F17A y 05H21A en macacos cynomolgus. A nivel de

- 15 aminoácidos, la forma madura de la IL-1 β humana y del macaco cynomolgus son 95 %

homólogas. La determinación de la afinidad a través de BIAcore indicó una alta afinidad por la IL-1 β de los monos cynomolgus para los tres mAb principales, lo que sugiere un epítipo conservado en los macacos cynomolgus (**Tabla 12**). Por el contrario, el canakinumab no reacciona de forma cruzada con IL-1 β de cynomolgus ya que su

5 epítipo antigénico incluye Glu64 en la secuencia humana, que es clave para el reconocimiento del anticuerpo ausente en la secuencia de IL-1 β del cynomolgus.

(Dhimolea E. Canakinumab. *MAbs*. 2010;2(1):3-13). De hecho, el tití se identificó como la única especie de primate no humano portadora de Glu64, lo que permitió realizar

estudios toxicológicos de canakinumab en esta especie. (Rondeau JM, Ramage P, Zurini

10 M, Gram H. The molecular mode of action and species specificity of canakinumab, a human monoclonal antibody neutralizing IL-1beta. *MAbs*. 2015;7(6):1151-1160).

Dada la alta afinidad por la IL-1 β de cynomolgus y los datos de mapeo de epítipos por intercambio de deuterio, predijimos que nuestro panel principal exhibiría actividad funcional en ensayos basados en células de cynomolgus. Para confirmar

15 nuestra predicción, establecimos ensayos basados en la liberación de IL-6 y G-CSF con IL-1 β recombinante de cynomolgus en fibroblastos primarios dérmicos y pulmonares de cynomolgus. Después, se evaluó la actividad neutralizante de 05H21A, 15N14A y

08F17A en ambos fibroblastos primarios de cynomolgus. Todos los mAb de anti-IL- 1 β principales exhibieron una actividad neutralizante dependiente de la dosis en fibroblastos

20 dérmicos y pulmonares de cynomolgus (**Figura 7**). Se activaron fibroblastos dérmicos de cynomolgus (CDF) y fibroblastos de pulmón de cynomolgus (CLF) con 5 pM y 15 pM de IL-1 β de cynomolgus recombinante, respectivamente. La **Tabla 21** captura las estimaciones modeladas de IC30, IC50 e IC90 en fibroblastos dérmicos (CDF) y

pulmonares (CLF) de cynomolgus. Los resultados que se muestran aquí confirmaron la actividad funcional de los tres mAb en macacos cynomolgus, estableciendo así la relevancia de esta especie para permitir estudios de toxicología aguas abajo.

Tabla 21. Valores inhibidores para el panel de anticuerpos primarios de IL-1 β en

5 fibroblastos primarios de cynomolgus

Dosis	Compuesto	IC30 (95 % de CI)	IC50 (95 % de CI)	IC90 (95 % de CI)
IL-6				
5 pM IL1 β (CDF)	15N14A	0,093 (0,051, 0,171)	0,156 (0,095, 0,257)	0,594 (0,193, 1,833)
	05H21A	0,089 (0,055, 0,145)	0,175 (0,117, 0,260)	0,997 (0,396, 2,510)
	08F17A	2,722 (1,981, 3,741)	5,096 (3,766, 6,895)	25,904 (12,420, 54,030)
15 pM de IL1 β (CLF)	15N14A	0,192 (0,095, 0,391)	0,376 (0,197, 0,718)	2,140 (0,443, 10,335)
	05H21A	0,214 (0,124, 0,367)	0,306 (0,207, 0,453)	0,779 (0,324, 1,874)
	08F17A	3,435 (1,585, 7,448)	6,969 (3,064, 15,851)	43,624 (5,649, 336,854)
G-CSF				
5 pM IL1 β (CDF)	05H21A	0,046 (0,031, 0,069)	0,059 (0,037, 0,095)	0,110 (0,041, 0,299)
	08F17A	1,923 (1,453, 2,544)	3,236 (2,555, 4,099)	12,480 (7,193, 21,651)
15 pM de IL1 β (CLF)	15N14A	0,129 (0,063, 0,264)	0,261 (0,140, 0,487)	1,629 (0,363, 7,302)
	05H21A	0,195 (0,108, 0,353)	0,270 (0,174, 0,421)	0,630 (0,283, 1,400)
	08F17A	3,584 (1,519, 8,456)	6,106 (2,722, 13,695)	24,308 (3,671, 160,959)
El modelo para 15N14A para 5 pM de IL1 β (CDF) para citocina G-CSF no logró converger.				

* Estimaciones modeladas de IC30, IC50 y IC90 para la liberación de IL-6 y G-CSF medidas después de la estimulación con 5 pM y 15 pM de rcynoll-1 β en fibroblastos dérmicos (CDF) y pulmonares (CLF) de cynomolgus, respectivamente. Los datos se informan en nM y el CI indica el intervalo de confianza.