

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 861 582**

⑫ Int. Cl.:

C07K 16/28	(2006.01)	A61P 11/06	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)	A61P 13/08	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)	A61P 13/12	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)	A61P 15/00	(2006.01)
A61P 1/02	(2006.01)	A61P 19/00	(2006.01)
A61P 1/04	(2006.01)	A61P 19/02	(2006.01)
A61P 1/16	(2006.01)	A61P 19/06	(2006.01)
A61P 1/18	(2006.01)	A61P 37/02	(2006.01)
A61P 9/10	(2006.01)	A61P 37/06	(2006.01)
A61P 11/00	(2006.01)		

⑬

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA TRAS OPOSICIÓN

T5

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2015 E 17185792 (3)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **07.02.2024 EP 3293202**

⑭ Título: **Anticuerpos contra la proteína accesoria del receptor de interleucina humana (IL1RAP) y usos de los mismos**

⑯ Prioridad:

05.03.2014 GB 201403875

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
18.09.2024

⑯ Titular/es:

**CANTARGIA AB (100.0%)
Scheelevägen 27
223 63 Lund, SE**

⑯ Inventor/es:

**ÅGERSTAM, HELENA;
FIORETOS, THOAS;
JÄRÅS, MARCUS;
MALMBORG HAGER, CECILIA ANN-CHRISTIN;
SJÖSTRÖM, KJELL;
SVEDBERG, AGNETA y
VON WACHENFELDT, KARIN**

⑯ Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra la proteína accesoria del receptor de interleucina humana (IL1RAP) y usos de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a agentes a base de anticuerpos para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades y afecciones asociadas a un biomarcador de IL-1 (específicamente, IL1RAP). En particular, se proporcionan agentes a base de anticuerpos para el tratamiento y diagnóstico de cánceres, incluyendo pero sin limitación a leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia mieloide aguda (LMA) y cánceres asociados a la formación de tumor sólido (tal como melanoma, cáncer de pulmón, y cáncer de la mama).

10 **Antecedentes de la invención**

15 *Biología de la interleucina-1*

La interleucina-1 (IL-1) es una potente citocina proinflamatoria que puede ser producida por varios tipos de células, incluyendo fagocitos mononucleares, en respuesta a infección e inflamación. La familia de la IL-1 consiste en siete agonistas, incluyendo IL-1 α y IL-1 β , y tres antagonistas naturales del receptor, incluyendo el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1 Ra) (Dinarello, CA, *Blood* 1996, 87(6): 2095-147). Se han identificado dos receptores de IL-1, IL-1R tipo I y IL-1R tipo II. Ambos receptores pueden interactuar con las tres formas de las moléculas de la familia de IL-1. El IL-1RI es responsable de mediar la actividad celular inducida por IL-1. Sin embargo, el complejo IL-1 / IL-1RI no puede enviar señales por sí mismo, sino que es dependiente de la asociación a una segunda cadena receptora, la proteína accesoria de IL-1R (IL1RAP) (Dinarello, CA, *Blood* 1996, 87(6): 2095-147). En contraste a IL-1RI, el IL-1RII no induce activación celular con la unión a IL-1 y por tanto el IL-1RII funciona como un receptor regulador señuelo, llevando a una disminución neta en la IL-1 disponible para unirse al IL-1RI.

Además de la señalización de IL1, la IL1RAP es crítica para mediar los efectos de IL33, a través del complejo ST2/IL1RAP, y la IL36, a través del complejo IL1Rrp2/IL1RAP (Garlanda *et al.*, *Immunity*, 12 de diciembre de 30 2013;39(6):1003-18).

La IL-1 es una potente citocina proinflamatoria, que es inducida en sitios de infección o inflamación local y está involucrada en la regulación de varios eventos fisiológicos y celulares (resumido en Dinarello CA, *CHEST*, 2000, 118: 35 503-508 y Dinarello, CA, *Clin Exp Rheumatol*, 2002, 20(5 Supl 27): S1-13). Es capaz de activar muchos tipos de células incluyendo leucocitos y células endoteliales. La IL-1 induce y amplifica las respuestas inmunológicas al promover la producción y expresión de moléculas de adhesión, citocinas, quimiocinas y otros mediadores inflamatorios tales como prostaglandina E₂ y óxido nítrico (NO). En consecuencia, se amplifica y se sostiene la inflamación local. Además, la producción inducida por IL-1 de mediadores inflamatorios da como resultado fiebre, dolor de cabeza, hipotensión y pérdida de peso. Además, la IL-1 es un factor de crecimiento hematopoyético y ha mostrado reducir el 40 nadir de leucocitos y plaquetas en pacientes durante el trasplante de médula ósea. La IL-1 también ha mostrado promover la angiogénesis al inducir la producción de factor de crecimiento endotelial vascular, promoviendo así la formación de pannus y suministro sanguíneo en las articulaciones reumáticas. Finalmente, la IL-1 ha mostrado promover la degradación ósea y de cartílago en enfermedades reumáticas.

45 *El papel de la IL-1 en las enfermedades*

La IL-1 está implicada en un amplio intervalo de enfermedades y afecciones que varían desde gota hasta cáncer (para revisiones, véase Dinarello *et al.*, 2012, *Nature Reviews* 11:633-652 y Dinarello, 2014, *Mol. Med.* 20 (supl. 1):S43-S58, incluyendo:

- 50
- enfermedades de articulaciones, huesos y músculo, tales como artritis reumatoide y artrosis;
 - enfermedades autoinflamatorias sistémicas hereditarias, tales como fiebre mediterránea familiar;
 - enfermedades autoinflamatorias sistémicas, tales como artritis idiopática juvenil sistémica y enfermedad de Still de inicio en el adulto;
 - enfermedades inflamatorias comunes, tales como gota y diabetes tipo 2;
 - enfermedades isquémicas de inicio agudo, tales como infarto de miocardio; y
 - cáncer.

60 Varias terapias para bloquear la actividad de IL-1 están siendo aprobadas y otras en desarrollo. El direccionamiento a IL-1 comenzó en 1993 con la introducción de anakinra (Kineret, Amgen), una forma recombinante del antagonista del receptor de natural (IL-1Ra), que bloquea la actividad tanto de IL-1 α como de IL-1 β ; este agente terapéutico se ha usado desde entonces para demostrar un papel para IL-1 en muchas enfermedades (véase lo anterior). El Anakinra actualmente domina el campo de los agentes terapéuticos de IL-1 debido a su propio récord de seguridad, semivida corta y múltiples rutas de administración. La neutralización de IL-1 con anticuerpos o receptores solubles también ha demostrado ser eficaz, y el receptor soluble señuelo rilonacept (Arcalyst, Regeneron) y el anticuerpo monoclonal

neutralizante anti-IL-1 β canakinumab (*Haris*, Novartis) se ha aprobado ahora. Otros enfoques terapéuticos, incluyendo la neutralización de IL-1 α , una vacuna terapéutica dirigida a IL-1 β y un IL-IRa quimérico, están en ensayos clínicos tempranos. Además, se han desarrollado los inhibidores de la molécula pequeña oralmente activa de la producción de L-1, tales como los inhibidores de caspasa 1, y están siendo probados.

5

IL1RAP como un biomarcador para trastornos neoplásicos

Los biomarcadores de tumor son proteínas endógenas o metabolitos cuyas cantidades o modificaciones indican el estado del tumor, las características de la progresión, y la respuesta a terapias. Están presentes en los tejidos del tumor o en los fluidos corporales y comprenden una amplia variedad de moléculas, incluyendo factores de transcripción, receptores de la superficie celular, y proteínas secretadas. Los marcadores de tumor efectivos tienen mucha demanda porque tienen el potencial de reducir las tasas de mortalidad por cáncer al facilitar el diagnóstico de cánceres en etapas tempranas y al ayudar a individualizar los tratamientos. Durante la última década, una mejor compresión de la carcinogénesis y progresión del tumor ha revelado un gran número de marcadores potenciales de tumor. Se predice que incluso más serán descubiertos en el futuro cercano con la aplicación de las tecnologías actuales tales como microarreglos de tejidos, arreglos de anticuerpos, y espectrometría de masa.

La proteína accesoria del receptor de Interleucina-1 (IL1RAP) ha sido identificado previamente como biomarcador de la superficie celular asociado con trastornos neoplásicos hematológicos tales como leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia mieloide aguda (LMA) y síndromes mielodisplásicos (SMD) (por ejemplo, véase el documento WO 2011/021014 de Cantargia AB, Jarás *et al.*, 2010, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 107(37):16280-5, Askmyr *et al.*, 2013, *Blood*, 121(18):3709-13 y Barreyro *et al.*, 2012, *Blood* 120(6):1290-8). Más recientemente, también se ha revelado la utilidad de la IL1RAP como un biomarcador de diagnóstico y terapéutico para tumores sólidos, tales como melanomas, (véase el documento WO 2012/098407 de Cantargia AB).

25

Por tanto, la presente invención busca proporcionar anticuerpos mejorados para uso en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades y afecciones asociadas al biomarcador de IL1RAP y/o que responden a la inhibición de la señalización de IL-1 y/o IL-33.

30

Sumario de la invención

Un primer aspecto de la invención proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo ("polipéptidos de anticuerpo") con especificidad de unión para la proteína accesoria del receptor de Interleucina-1 ("IL1RAP"), en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es capaz de inhibir la unión del anticuerpo "CAN04" de referencia con la IL1RAP humana, y en donde el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 8 a 11 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con las mismas:

i. Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A
 S G Y A F S S S W M N W V R Q A P G Q G L E W
 M G R I Y P G D G N T H Y A Q K F Q G R V T L
 T A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y
 Y C G E G Y L D P M D Y W G Q G T L V T V S S

[SEQ ID NO: 8];

ii. Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A
 S G Y A F T S S S W M N W V R Q A P G Q G L E W
 M G R I Y P G D G N T H Y A Q K F Q G R V T L
 T A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y
 Y C G E G Y L D P M D Y W G Q G T L V T V S S

[SEQ ID NO: 9];

iii. Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A
 S G Y T F T S S W M N W V R Q A P G K G L E W
 M G R I Y P G D G Q T H Y A Q K F Q G R V T L
 T A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y
 Y C G E G Y L D P M D Y W G Q G T L V T V S S

[SEQ ID NO: 10]; o

iv. Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A
 S G Y T F T S S W M N W V R Q A P G K G L E W
 M G R I Y P G D G Q T H Y A Q K F Q G R V T I
 T A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y
 Y C G E G Y L D P M D Y W G Q G T L V T V S S

[SEQ ID NO: 11],

5 y una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 15 a 17 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con las mismas:

v. D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A
 S Q G I N N Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I
 H Y T S G L H A G V P S R F S G S G S G T D Y
 T L T I S S L Q P E D V A T Y Y C Q Q Y S I L P
 W T F G G G T K V E I K R

[SEQ ID NO: 15];

10 vi. D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C Q
 A S Q G I N N Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L
 I H Y T S G L H A G V P S R F S G S G S G T D
 Y T L T I S S L E P E D V A T Y Y C Q Q Y S I L
 P W T F G G G T K V E I K R

[SEQ ID NO: 16]; o

vii. D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C
 Q A S Q G I N N Y L N W Y Q Q K P G K A P K L
 L I H Y T S G L H A G V P S R F S G S G S G T
 D F T L T I S S L E P E D V A T Y Y C Q Q Y S I
 L P W T F G G G T K V E I K R

[SEQ ID NO: 17];

15 y en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno presenta una o más de las siguientes propiedades:

(a) una afinidad de unión (K_D) por la IL1RAP humana de 200 pM o mayor, es decir, la $K_D \leq 200$ pM (por ejemplo, como se determina en el Ejemplo A); y/o

20 b) capacidad de internalización al unirse a una o más líneas celulares de cáncer (tal como una línea celular de LMC, LMA y/o melanoma) (por ejemplo, como se determina en el Ejemplo G).

Por "proteína accesoria del receptor de Interleucina-1", "IL1RAP" y "IL1-RAP" específicamente se incluye la proteína humana IL1RAP, por ejemplo, como se describe en el n.º de Acceso de GenBank AAB84059, Secuencia de Referencia de NCBI: NP_002173.1 y n.º de Acceso de UniProtKB/Swiss-Prot: Q9NPH3-1 (véase también Huang *et al.*, 1997, *Proc Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 94 (24), 12829-12832). La IL1RAP es también conocida en la literatura científica como IL1R3, C3orf13, FLJ37788, IL-IRAcP y EG3556.

Por tanto, los polipéptidos de anticuerpo de la invención tienen especificidad para IL1RAP. Por "especificidad" se quiere decir que el polipéptido de anticuerpo es capaz de unirse a IL1RAP *in vivo*, es decir, bajo las condiciones fisiológicas en las que existe la IL1RAP dentro del cuerpo humano. Preferiblemente, el polipéptido de anticuerpo no

se une a ninguna otra proteína *in vivo*. Tal especificidad de unión puede ser determinada por métodos bien conocidos en la técnica, tal como ELISA, inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, transferencias Western y citometría de flujo usando células transfectadas que expresan IL1RAP. Ventajosamente, el polipéptido de anticuerpo es capaz de unirse selectivamente a IL1RAP, es decir, se une al menos 10 veces más fuertemente a IL1RAP que cualquier otra proteína.

- 5 Por "anticuerpo CAN04" de referencia"" se incluye un anticuerpo IgG intacto que comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente. A menos que se indique de otro modo, las referencias en la presente a "CAN04" se refieren a un anticuerpo IgG intacto que comprende (a) una cadena pesada que comprende una región variable como se define por SEQ ID NO:1 y una región 10 constante como se define por SEQ ID NO: 19, y (b) una cadena ligera que comprende una región variable como se define por SEQ ID NO:2 y una región constante como se define por SEQ ID NO: 18. Como alternativa, una versión 15 humanizada de CAN04 ("hCAN04") puede usarse como el anticuerpo de referencia. Por ejemplo, el anticuerpo de referencia puede ser un anticuerpo IgG intacto que comprende (s) una cadena pesada que comprende una región variable como se define por cualquiera de SEQ ID NO:8 a 11 y una región constante como se define por SEQ ID NO: 19, y (b) una cadena ligera que comprende una región variable como se define por cualquiera de SEQ ID NO:15 a 17 y una región constante como se define por SEQ ID NO: 18.

Como se discute después, el anticuerpo "CAN04" de referencia" se une al dominio 2 de IL1RAP. Por tanto, se apreciará 20 que el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de la invención, también se unen al dominio 2 de IL1RAP.

25 Por "capaz de inhibir la unión del anticuerpo "CAN04" de referencia" a IL1RAP humana" se entiende que la presencia de los polipéptidos de anticuerpo de la invención inhibe, totalmente o en parte, la unión de "CAN04" a la IL1RAP humana. Tal inhibición de unión competitiva puede determinarse usando ensayos y métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, usando placas BIACore con IL1RAP inmovilizada e incubando con el anticuerpo "CAN04" de referencia" con y sin un polipéptido de anticuerpo a ser probado. Como alternativa, puede usarse un enfoque de mapeo 30 por pares, en donde el anticuerpo "CAN04" de referencia" se inmoviliza en la superficie de la placa de BIACore, el antígeno de IL1RAP se une al anticuerpo inmovilizado, y después un segundo anticuerpo se prueba para la capacidad de unión simultánea a IL1RAP (véase "BIACore Assay Handbook", GE Healthcare Life Sciences, 29-0194-00 AA 05/2012).

35 En una alternativa adicional, la inhibición de unión competitiva puede ser determinada usando citometría de flujo por ejemplo, para probar si un anticuerpo de prueba es capaz de inhibir la unión del anticuerpo CAN04 de referencia a un antígeno de superficie celular, las células que expresan el antígeno pueden preincubarse con el anticuerpo de prueba por 20 min antes de que las células sean lavadas e incubadas con el anticuerpo CAN04 de referencia conjugado a un fluoróforo, que puede ser detectado por citometría de flujo. Si la preincubación con el anticuerpo de prueba reduce la 40 detección del anticuerpo CAN04 de referencia en la citometría de flujo, el anticuerpo de prueba inhibe la unión del anticuerpo de referencia al antígeno de la superficie celular. Por tanto, si el anticuerpo que se va a probar presenta alta afinidad por IL1RAP, puede usarse un periodo de preincubación reducido (o incluso no hacer preincubación).

45 En una alternativa adicional, la inhibición de unión competitiva puede ser determinada usando un ELISA (por ejemplo, como se describe en el Ejemplo J).

Por "un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo" se incluye sustancialmente las moléculas de anticuerpo intacto, así como anticuerpos químéricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos aislados, 50 anticuerpos de una cadena, anticuerpos biespecíficos, cadenas pesadas de anticuerpo, cadenas ligeras de anticuerpo, homodímeros y heterodímeros de cadenas pesada y/o ligera de anticuerpos, y fragmentos de unión a antígeno y derivados de los mismos. Fragmentos de unión a antígeno y derivados adecuados incluyen, pero no se limitan necesariamente a, fragmentos de Fv (por ejemplo, Fv de una cadena y Fv unido a bisulfuro), fragmentos tipo Fab (por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos Fab" y fragmentos F(ab)2), dominios de una variable (por ejemplo, dominios de VH y VL) y anticuerpos de dominio (dAbs, incluyendo formatos simples y dobles [es decir, dAb-enlazador-dAb]). Las ventajas potenciales de usar fragmentos de anticuerpo, más que anticuerpos enteros, son muchas veces. El menor tamaño de los fragmentos puede llevar a mejores propiedades farmacológicas, tales como mejor penetración de tejido sólido. Más aún, los fragmentos de unión a antígeno tales como fragmentos de anticuerpo Fab, Fv, ScFv y dAb pueden expresarse en y secretarse de *E. coli*, facilitando así la fácil producción de grandes cantidades de dichos fragmentos.

55 La expresión "un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo" también pretende comprender imitadores de anticuerpo (por ejemplo, estructuras de andamiaje sin anticuerpo que tienen un alto grado de estabilidad pero que permiten la variabilidad de introducirse en ciertas posiciones). Los expertos en la técnica de la bioquímica estarán familiarizados con muchas de esas moléculas, como se discute en Gebauer y Skerra, 2009, *Curr Opin Chem Biol* 13(3): 245-255. Imitadores de anticuerpos a modo de ejemplo incluyen: aficuerpos (también llamados Trinectinas; Nygren, 2008, *FEBS J*, 275, 2668-2676); CTLDs (también llamados Tetranectinas; *Innovations Pharmac Technol.* (2006), 27-30); adnectinas (también llamadas monocuerpos; *Meth. Mol. Biol.*, 352 (2007), 95-109); anticalinas (*Drug Discovery Today* (2005), 10, 23-33); DARPinas (ankirinas; *Nat Biotechnol* (2004), 22, 575-582); avímeros (*Nat Biotechnol* (2005), 23, 1556-1561); microcuerpos (*FEBS J*, (2007), 274, 86-95); aptámeros de péptido (*Expert. Opin. Biol. Ther* (2005), 5, 783-797); dominios de Kunitz (*J Pharmacol. Exp. Ther* (2006) 318, 803-809); afilinas (*Trends. Biotechnol* (2005), 23, 514-522); afímeros (Avacta Life Sciences, Wetherby, RU).

5 También se incluyen dentro del alcance de la invención receptores quiméricos de los linfocitos T (también conocidos como receptores quiméricos de linfocitos T, inmunorreceptores quiméricos, y receptores quiméricos de antígenos o CAR) (véase Pule *et al.*, 2003, *Cytotherapy* 5(3):211-26). Estos son receptores diseñados, que injertan una especificidad arbitraria sobre una célula efectora inmune. Normalmente, los CAR se usan para injertar la especificidad de un anticuerpo monoclonal sobre un linfocito T; con la transferencia de su secuencia codificadora facilitada por vectores retrovíricos. La forma más común de esas moléculas son las fusiones que comprenden un fragmento variable de una cadena (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal fusionado a transmembrana y endodomino de CD3-zeta. Cuando los linfocitos T expresan su molécula de fusión, reconocen y eliminan las células diana que expresan la especificidad transferida del anticuerpo monoclonal.

10 15 Los expertos en la técnica apreciarán además que la invención también abarca las versiones modificadas de los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, por ejemplo, existentes ahora o en el futuro, por ejemplo, modificados por la unión covalente de polietilenglicol u otro polímero adecuado (véase lo siguiente).

15 20 25 Los métodos para generar anticuerpos y fragmentos de anticuerpo son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos pueden generarse a través de cualquiera de muchos métodos que emplean la inducción de la producción *in vivo* de moléculas de anticuerpo, investigadas de bibliotecas de inmunoglobulina (Orlandi. *et al.*, 1989. *Proc Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86:3833-3837; Winter *et al.*, 1991, *Nature* 349:293-299) o generación de moléculas de anticuerpo monoclonal por líneas celulares moléculas en cultivo. Estos incluyen, pero no se limitan a, la técnica del hibridoma, la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos, y la técnica de virus de Epstein-Barr (EBV)-hibridoma (Kohler *et al.*, 1975. *Nature* 256:4950497; Kozbor *et al.*, 1985. *J Immunol. Methods* 81:31-42; Cote *et al.*, 1983. *Proc Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 80:2026-2030; Cole *et al.*, 1984. *Mol. Cell. Biol.* 62:109-120).

30 35 40 Los métodos adecuados para la producción de anticuerpos monoclonales también se revelan en "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) y en "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications" J G R Hurrell (CRC Press, 1982).

30 35 Del mismo modo, los fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse usando métodos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, cuyas revelaciones se incorporan en la presente como referencia). Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo según la presente invención pueden ser preparados por hidrólisis proteolítica del anticuerpo o por expresión en *E coli* o células de mamífero (por ejemplo, cultivo de células de ovario de hámster chino u otro sistema de expresión de proteínas) de ADN que codifica al fragmento. Como alternativa, los fragmentos de anticuerpo pueden ser obtenidos por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos enteros por métodos convencionales.

Los anticuerpos de la invención se definen con referencia a las regiones variables de un anticuerpo derivado de murino, designado "CAN04", que comprende:

40 (a) una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de

Q V Q L Q Q S G P E L L K P G A S V K I S C K A S
G Y A F S S S W M N W V K Q R P G K G L E W I G
R I Y P G D G N T H Y S G K F K G K A T L T A D K
S S S I A Y M Q L S S L T S E D S A V Y F C G E G
Y L D P M D Y W G Q G T S V T V S S

[SEQ ID NO:1]

y

45 (b) una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de
SEQ ID NO: 2:

D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T I S C S A
 S Q G I N N Y L N W Y Q Q K P D G T V K L L I H Y
 T S G L H A G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I
 S N L E P E D V A T Y Y C Q Q Y S I L P W T F G
 G G T K L E I K R

[SEQ ID NO:2]

El término "aminoácido" como se usa en la presente incluye los veinte aminoácidos estándar codificados genéticamente y sus correspondientes estereoisómeros en la forma "D" (en comparación a la forma natural "L"), 5 aminoácidos omega y otros aminoácidos naturales, aminoácidos no convencionales (por ejemplo aminoácidos α,α -bisustituidos, N-alquil aminoácidos, etc.) y aminoácidos químicamente derivatizados (véase lo siguiente).

Cuando un aminoácido se enumera específicamente, tal como "alanina" o "Ala" o "A", el término se refiere tanto a la 10 L-alanina como a la D-alanina a menos que explícitamente se indique de otro modo. Otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para los polipéptidos de la presente invención, en tanto que se retenga la propiedad funcional deseada por el polipéptido. Para los péptidos mostrados, cada residuo de aminoácido codificado, cuando sea apropiado, se representa por la designación de una sola letra, correspondiente al nombre trivial del aminoácido convencional.

15 En una realización, los polipéptidos de anticuerpo como se definen en la presente comprenden o consisten en L-aminoácidos.

Será apreciado por los expertos en la técnica que cualquier anticuerpo IgG intacto que comprenda las regiones 20 variables anteriores puede usarse como el anticuerpo de referencia para identificar los polipéptidos de anticuerpo de la invención que inhiben competitivamente la unión de CAN04 a IL1RAP.

Por tanto, en una realización, el anticuerpo CAN04 usado como una referencia para un enlazador competitivo determinado es un anticuerpo IgG intacto que comprende:

25 (a) una cadena pesada que comprende un dominio variable de SEQ ID NO: 1 injertado en una región constante de IgG1 o IgG2a de murino

(b) una cadena ligera que comprende un dominio variable de SEQ ID NO: 2 injertado en una región constante kappa de murino.

30 Como alternativa, el anticuerpo de referencia puede ser un anticuerpo IgG intacto químérico que comprende:

(a) una cadena pesada que comprende un dominio variable de SEQ ID NO: 1 injertado en una región constante de IgG1 humana (por ejemplo, como se codifica por el vector pFUSEss-CHIg-hG1 de InvivoGen, San Diego, 35 EE.UU.)

(b) una cadena ligera que comprende un dominio variable de SEQ ID NO: 2 injertado en una región constante kappa humana (por ejemplo, como se codifica por el vector pFUSE2ss-CLlg-hk de InvivoGen, San Diego, EE.UU.).

40 La unión competitiva normalmente surge porque el anticuerpo de prueba se une a, o al menos muy cerca del epítopo en el antígeno al que se une el anticuerpo de referencia (en este caso, CAN04). Sin embargo, será apreciado por los expertos en la técnica que la unión competitiva puede también surgir en virtud de la interferencia estérica; entonces, el anticuerpo de prueba puede unirse a un epítopo diferente de ese al que se une el anticuerpo de referencia, pero puede ser aún de suficiente tamaño o configuración para impedir la unión del anticuerpo de referencia al antígeno.

45 Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la presente invención se identificaron después de una extensa investigación de un gran número de anticuerpos anti-IL1RAP, basándose en la presentación de propiedades que los hacen particularmente adecuados como agentes de diagnóstico y terapéuticos para cáncer.

50 Por tanto, en una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno presenta una o más de las siguientes propiedades:

(a) reactividad cruzada con IL1RAP de *Macaca fascicularis* (por ejemplo, como se determina en el Ejemplo D);
 (b) una acción inhibidora en la señalización de IL1 (IL-1 α y/o IL-1 β ; por ejemplo, como se determina en el Ejemplo E); y/o

(c) la capacidad de inducir citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) en una o más líneas celulares de cáncer (tales como líneas celulares de LMC, LLA y/o melanoma) (por ejemplo, como se determina en el Ejemplo F).

5 Ventajosamente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno presenta todas las propiedades anteriores.

En una realización alternativa, el anticuerpo o fragmento de unión a no es capaz de inducir ADCC.

10 En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es capaz de unirse a un epítopo en el dominio extracelular de IL1RAP que se superpone, al menos en parte, con el epítopo en IL1RAP al que el anticuerpo de referencia CAN04 es capaz de unirse. Por tanto, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede ser capaz de unirse a un epítopo ubicado en/dentro del dominio 2 de IL1RAP (véase Wang *et al.*, 2010, *Nature Immunology*, 11:905-912), es decir, dentro de los aminoácidos 135 a 234 de IL1RAP (véase el n.º de Acceso Q9NPH3 dentro de UniProtKB/Swiss-Prot). Por ejemplo, el epítopo en que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede ubicarse dentro de los aminoácidos 135 a 154, 155 a 174, 175 a 194, 195 a 214 o entre los aminoácidos 215 a 234 de IL1RAP. Sin embargo, se apreciará que el epítopo puede ser no lineal.

15 En una realización, el polipéptido de anticuerpo de la invención comprende o consiste en un anticuerpo intacto (tal como un anticuerpo IgG1).

20 En una realización alternativa, el polipéptido de anticuerpo de la invención comprende o consiste en un fragmento de unión a antígeno seleccionado del grupo que consiste en fragmentos Fv (por ejemplo, Fv de una cadena y Fv unido a bisulfuro), fragmentos de tipo Fab (por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos Fab" y fragmentos F(ab)2) y anticuerpos de dominio (por ejemplo, dominios variables únicos de V_H o dominios variables de V_L).

25 En otra realización, como se ha comentado anteriormente, el polipéptido de la invención comprende o consiste en un imitador de anticuerpos seleccionado del grupo que comprende o consiste en aficuerpos, tetraneptinas (CTLD), adnectinas (monocuerpos), anticalinas, DARPinas (ankirinas), avímeros, iMabs, microcuerpos, aptámeros peptídicos, dominios de Kunitz y afilinas.

30 En una realización preferida, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según el primer aspecto de la invención comprende una región variable de cadena pesada que comprende las siguientes CDR:

35 a) GYAFSSS [SEQ ID NO: 3] o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 60 % de identidad de secuencia con la misma, por ejemplo, al menos un 70 %, 80 % o 90 % de identidad de secuencia;
 b) YPGDGN [SEQ ID NO: 4] o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 60 % de identidad de secuencia con la misma, por ejemplo, al menos un 70 %, 80 % o 90 % de identidad de secuencia, y/o
 c) GYLDPMY [SEQ ID NO: 5] o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 60 % de identidad de secuencia con la misma, por ejemplo, al menos un 70 %, 80 % o 90 % de identidad de secuencia.

40 Por tanto, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo, puede comprender una región variable de cadena pesada que comprenda las CDR de las SEQ ID NO: 3, 4 y 5.

45 Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la correspondiente región del anticuerpo CAN04 de referencia, es decir, SEQ ID NO:1.

50 Sin embargo, se apreciará que un bajo nivel de mutación (normalmente, solo uno o dos aminoácidos) dentro de una secuencia CDR puede tolerarse sin pérdida de la especificidad del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno por IL1RAP.

55 El porcentaje de identidad puede determinarse, por ejemplo, con el programa LALIGN (Huang y Miller, *Adv. Appl. Math.* (1991) 12:337-357) en el sitio de la instalación Expasy (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html) utilizando como parámetros la opción de alineación global, la matriz de puntuación BLOSUM62, la penalización por apertura de hueco -14, la penalización por extensión de hueco -4. Alternativamente, el porcentaje de identidad de secuencia entre dos polipéptidos puede determinarse utilizando programas informáticos adecuados, por ejemplo, el programa GAP de la Universidad de Wisconsin Genetic Computing Group y se apreciará que el porcentaje de identidad se calcula en relación con los polipéptidos cuya secuencia se ha alineado de forma óptima.

60 La alineación puede realizarse alternativamente utilizando el programa Clustal W (como se describe en Thompson *et al*, 1994, *Nucl. Acid Res.* 22:4673-4680). Los parámetros utilizados pueden ser los siguientes:

- Parámetros de alineación rápida por pares: Tamaño de la K-tupla(palabra); 1, tamaño de la ventana; 5, penalización por hueco; 3, número de diagonales superiores; 5. Método de puntuación: x por ciento.
- Parámetros de alineación múltiple: penalización por apertura de hueco; 10, penalización por extensión de hueco; 0,05.

- Matriz de puntuación: BLOSUM.

Como alternativa, se puede utilizar el programa BESTFIT para determinar las alineaciones locales de las secuencias.

5 En otra realización preferida, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según el primer aspecto de la invención, comprende una región variable de cadena pesada que comprende las siguientes CDR:

10 a) GYAFSSSWMN [**SEQ ID NO: 6**] o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 60 % de identidad de secuencia con la misma, por ejemplo, al menos un 70 %, 80 % o 90 % de identidad de secuencia.

b) RIYPGDGNTHYSGKFKG [**SEQ ID NO: 7**] o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 60 % de identidad de secuencia con la misma, por ejemplo, al menos un 70 %, 80 % o 90 % de identidad de secuencia; y

c) GYLDPMY [**SEQ ID NO: 5**] o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 60 % de identidad de secuencia con la misma, por ejemplo, al menos un 70 %, 80 % o 90 % de identidad de secuencia.

15 Por ejemplo, el polipéptido de anticuerpo puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende las CDR de SEQ ID NO 6, 7 y 5.

Como se indicó antes, el anticuerpo CAN04 de referencia es un anticuerpo de murino. Sin embargo, las cadenas pesada y ligera componentes de este anticuerpo pueden ser humanizadas para producir polipéptidos de anticuerpo más adecuados para uso en seres humanos, por ejemplo, debido a su inmunogenicidad reducida. Por ejemplo, las CDR de SEQ ID NO 3, 4 y 5 (o las CDR de SEQ ID NO 6, 7 y 5) pueden injertarse en un marco de región variable humana.

20 25 Será apreciado por los expertos en la técnica que, para la terapia en seres humanos, se usan preferiblemente anticuerpos humanos o humanizados. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de murino) son anticuerpos o fragmentos de anticuerpo químicos diseñados genéticamente que tienen preferiblemente porciones mínimas derivadas de anticuerpos no humanos. Los anticuerpos humanizados incluyen anticuerpos en los que las regiones determinantes de complementariedad de un anticuerpo humano (anticuerpo receptor) se reemplazan por residuos de una región determinante de complementariedad de una especie no humana (anticuerpo de donador)

30 35 tal como ratón, rata o conejo que tiene la funcionalidad deseada. En algunos casos, los residuos de marco de Fv del anticuerpo humano se reemplazan por correspondientes residuos no humanos. Los anticuerpos humanizados pueden también comprender residuos no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de marco o de región determinante de complementariedad. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones determinantes de complementariedad corresponden a esas de un anticuerpo no humano y todas, o sustancialmente todas, las regiones de marco corresponden a esas de una secuencia consenso humana relevante. Los anticuerpos humanizados óptimamente también incluyen al menos una porción de una región constante de anticuerpo, tal como una región Fc, normalmente derivada de un anticuerpo humano (véase, por ejemplo, Jones *et al.*, 1986. *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988. *Nature* 332:323-329; Presta, 1992, *Curr Op. Struct Biol.* 2:593-596).

40 45 50 Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. En general, el anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos, llamados a menudo residuos importados, normalmente se toman de un dominio variable importado. La humanización puede realizarse esencialmente como se describe (véase, por ejemplo, Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-525; Reichmann *et al.*, 1988. *Nature* 332:323-327; Verhoeyen *et al.*, 1988, *Science* 239:1534-15361; documento US 4,816,567) al sustituir las regiones humanas determinantes de complementariedad con correspondientes regiones de roedor determinantes de complementariedad. En consecuencia, esos anticuerpos humanizados son anticuerpos químicos, en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados pueden ser normalmente anticuerpos humanos en los que los residuos de la región determinante de complementariedad y posiblemente algunos residuos de marco se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

55 Los anticuerpos humanos pueden también ser identificados usando varias técnicas conocidas en la técnica, incluyendo bibliotecas de despliegue de fagos (véase, por ejemplo, Hoogenboom y Winter, 1991, *J Mol. Biol.* 227:381; Marks *et al.*, 1991, *J Mol. Biol.* 222:581; Cole *et al.*, 1985, en: "Monoclonal antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, pág. 77; Boerner *et al.*, 1991. *J. Immunol.* 147:86-95).

60 Por tanto, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención puede ser humanizado.

Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede comprender una región variable de cadena pesada que tenga una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 8 a 11.

65 En una realización preferida relacionada, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena ligera que comprende las siguientes CDR:

- 5 a) SASQGINNYLN [SEQ ID NO: 12] o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 60 % de identidad de secuencia con la misma, por ejemplo, al menos un 70 %, 80 % o 90 % de identidad de secuencia.
 b) YTSGLHA [SEQ ID NO: 13] o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 60 % de identidad de secuencia con la misma, por ejemplo, al menos un 70 %, 80 % o 90 % de identidad de secuencia; y/o
 c) QQYSILPWT [SEQ ID NO: 14] o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 60 % de identidad de secuencia con la misma, por ejemplo, al menos un 70 %, 80 % o 90 % de identidad de secuencia.

10 Por tanto, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo, puede comprender una región variable de cadena ligera que comprenda las CDR de las SEQ ID NO: 12, 13 y 14.

15 Como en el caso de la región variable de cadena pesada detallada antes, se apreciará que la región variable de cadena ligera del polipéptido de anticuerpo de la invención, puede humanizarse para producir agentes más adecuados para su uso en seres humanos. Por ejemplo, las CDR de SEQ ID NO 12, 13 y 14 pueden injertarse en un marco de región variable humana.

15 Por ejemplo, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una región variable de cadena ligera que tenga una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 15 a 17.

20 Como alternativa, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una región variable de cadena pesada humanizada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 8 a 11 y una región variable de cadena ligera humanizada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 15 a 17.

25 Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender:

- a) una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;
 b) una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;
 c) una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;
 d) una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;
 e) una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16;
 f) una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16;
 g) una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16;
 h) una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16;
 i) una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17;
 j) una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17;
 k) una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; o
 l) una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

65 Será apreciado por los expertos en la técnica que los anticuerpos humanizados o fragmentos de unión a antígeno antes definidos de la invención pueden comprender además una región constante de cadena pesada, o parte de la misma (véase lo siguiente).

En una realización, el polipéptido de anticuerpo comprende una región CH1, CH2 y/o CH3 de una cadena pesada e IgG (tal como una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). Por tanto, el polipéptido de anticuerpo puede comprender parte o todas las regiones constantes de una cadena pesada de IgG1. Por ejemplo, el polipéptido de anticuerpo puede ser un fragmento Fab que comprende las regiones constantes de CH1 y CL, combinadas con cualquiera de las regiones variables de cadena pesada y ligera definidas antes respectivamente.

Del mismo modo, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno definidos antes de la invención pueden comprender además una región constante de cadena ligera, o parte de la misma (véase lo siguiente). Por ejemplo, el polipéptido de anticuerpo puede comprender una región CL de una cadena ligera kappa o lambda.

Por ejemplo, el polipéptido de anticuerpo puede comprender las siguientes regiones constantes:

(a) *Región C de cadena kappa de Ig (Homo sapiens) (UnitProt el n.º de Acceso P01834)*

TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN
SQESVTEQDS KDSTYSLSSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS

FNRGEC

[SEQ ID NO: 18]

(b) *Región C de cadena gamma-1 de Ig (Homo sapiens) (UnitProt el n.º de Acceso P01857)*

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPPV LDSDGSSFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

[SEQ ID NO: 19]

En una realización alternativa, pueden utilizarse las variantes naturales de las regiones constantes anteriores pueden (por ejemplo, véase Jefferis y Lefranc, 2009, *MAbs* 1(4):332- 8). Por ejemplo, la región constante de cadena ligera puede comprender o consistir de SEQ ID NO: 18 que tiene una mutación W40R y/o V83L y/o la región constante de cadena pesada puede comprender o consistir de SEQ ID NO: 19 que tiene una mutación K97R, D239E y/o L241M, o sin la lisina/K en la terminal C (en donde la posición de las mutaciones de aminoácidos se define usando el Esquema de Numeración Eu, que difiere de la numeración en SEQ ID NO: 18 y 19; véase Edelman *et al.*, 1969, *Proc Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 63:78-85).

Por tanto, los polipéptidos de anticuerpo a modo de ejemplo de la invención comprenden:

(a) una cadena pesada que comprende una región variable de SEQ ID NO: 8, 9, 10 o 11 junto con una región constante de SEQ ID NO: 19; y
(b) una cadena ligera que comprende una región variable de SEQ ID NO: 15, 16 o 17 junto con una región constante de SEQ ID NO: 18.

En una realización relacionada, el polipéptido de anticuerpo puede comprender una región Fc de anticuerpo (por ejemplo, las regiones CH2 y CH3 de una cadena pesada de IgG). Será apreciado por un experto que la porción Fc puede ser de un anticuerpo IgG, o de una clase diferente de anticuerpo (tal como IgM, IgA, IgD o IgE). En una realización, la región Fc es de un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

La región Fc puede ser natural (por ejemplo, parte de un anticuerpo producido endógenamente) o puede ser artificial (por ejemplo, comprende una o más mutaciones puntuales con respecto a una región Fc natural).

Como está bien documentado en la técnica, la región Fc de un anticuerpo media su semivida en suero y las funciones efectoras, tales como citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP).

5 El diseño de la región Fc de un anticuerpo monoclonal terapéutico o proteína de fusión a Fc permite la generación de moléculas que están mejor adaptadas para la actividad farmacológica requerida de ellas (Strohl, 2009, *Curr Opin Biotechnol* 20(6):685-91).

(a) *Regiones de Fc diseñadas para una mayor semivida*

10 Un enfoque para mejorar la eficacia de un anticuerpo terapéutico es aumentar su persistencia en suero, permitiendo así mayores niveles en circulación, administración menos frecuente y dosis reducidas.

15 La semivida de un IgG depende de su unión dependiente del pH al receptor neonatal FcRn. El FcRn, que se expresa en la superficie de células endoteliales, se une al IgG en una manera dependiente del pH y lo protege de la degradación.

20 Algunos anticuerpos que selectivamente se unen al FcRn a pH 6,0, pero no a pH 7,4, presentan una mayor semivida en varios modelos animales.

25 Muchas mutaciones ubicadas en la interfaz entre los dominios CH2 y CH3, tal como T250Q/M428L (Hinton *et al.*, 2004, *J Biol Chem.* 279(8):6213-6) y M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F (Vaccaro *et al.*, 2005, *Nat Biotechnol.* 23(10):1283-8), han demostrado aumentar la afinidad de unión a FcRn y la semivida de IgG1 *in vivo*.

(b) *Regiones de Fc diseñadas para una función efectora alterada*

Dependiendo de la aplicación del anticuerpo terapéutico o proteína de fusión Fc, puede ser deseable ya sea reducir o aumentar la función efectora (tal como ADCC).

30 Para los anticuerpos que se dirigen a las moléculas de la superficie celular, especialmente esas en células inmunes, puede requerirse abrogar las funciones efectoras para ciertas indicaciones clínicas.

35 Por el contrario, para los anticuerpos ideados para uso oncológico (tal como en el tratamiento de leucemias y tumores sólidos; véase lo siguiente), aumentar las funciones efectoras puede mejorar la actividad terapéutica.

35 Para los cuatro isótipos de IgG humana que se unen a los receptores de Fcγ activadores (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIa), el receptor de FcγRIIb inhibidor, y el primer componente del complemento (C1q) con diferentes afinidades, produciendo funciones efectoras muy diferentes (Bruhns *et al.*, 2009, *Blood*. 113(16):3716-25).

40 La unión de IgG a FcγRs o C1q depende de los residuos ubicados en la región de bisagra y el dominio de CH2. Dos regiones del dominio de CH2 son críticas para la unión de FcγRs y C1q, y tienen secuencias únicas en IgG2 e IgG4. Las sustituciones en IgG1 humana de los residuos de IgG2 en las posiciones 233-236 y los residuos de IgG4 en las posiciones 327, 330 y 331 demostraron reducir en gran medida el ADCC y CDC (Armour *et al.*, 1999, *Eur J Immunol* 29(8):2613-24; Shields *et al.*, 2001, *J Biol Chem.* 276(9):6591-604). Además, Idusogie *et al.* demostraron que la sustitución de alanina en diferentes posiciones, incluyendo K322, redujeron apreciablemente la activación del complemento (Idusogie *et al.*, 2000, *J Immunol* 164(8):4178-84). De modo similar, las mutaciones en el dominio de CH2 de IgG2A de murino mostraron reducir la unión a FcγRI, y C1q (Steurer. *et al.*, 1995. *J Immunol* 155(3):1165- 74).

50 Se han hecho muchas mutaciones en el dominio de CH2 de IgG1 humana y su efecto en ADCC y CDC probado *in vitro* (véase las referencias citadas antes). Notablemente, la sustitución de alanina en la posición 333 se reportó aumentando tanto el ADCC como el CDC (Shields *et al.*, 2001, *supra*; Steurer *et al.*, 1995, *supra*). Lazar *et al.* describieron un mutante triple (S239D/I332E/A330L) con una mayor afinidad por FcγRIIa y una menor afinidad por FcγRIIb resultando en un ADCC mejorado (Lazar *et al.*, 2006, *PNAS* 103(11):4005-4010). Las mismas mutaciones se usaron para generar un anticuerpo con aumento en ADCC (Ryan *et al.*, 2007, *Mol. Cancer Ther* 6:3009-3018). Richards *et al.* estudiaron un mutante triple ligeramente diferente (S239D/I332E/G236A) con una mejor afinidad de FcγRIIa y proporción de FcγRIIa/FcγRIIb que media una mayor fagocitosis de las células diana por macrófagos (Richards *et al.*, 2008. *Mol Cancer Ther.* 7(8):2517-27).

60 Debido a la falta de funciones efectoras, los anticuerpos IgG4 representan una subclase preferida de IgG para el bloqueo del receptor sin agotamiento celular (es decir, inhibición de señalización de IL-1). Las moléculas de IgG4 pueden intercambiar medias moléculas en un proceso dinámico llamado intercambio de brazo Fab. Este fenómeno también puede ocurrir *in vivo* entre los anticuerpos terapéuticos y el IgG4 endógeno.

La mutación S228P, ha mostrado prevenir este proceso de recombinación permitiendo el diseño de anticuerpos de IgG4 terapéuticos menos impredecibles (Labrijn *et al.*, 2009, *Nat Biotechnol* 27(8):767-71).

65 Ejemplos de regiones de Fc diseñadas se muestran en la Tabla 1 y Ejemplo J siguiente.

TABLA 1

<u>Ejemplos de Fc Diseñadas</u>				
Isotipo	Especie	Mutaciones*	Unión FcR/C1q	Función efectora
IgG1	Humana	T250Q/M428L ¹	Aumento de unión a FcRn	Aumento de semivida
IgG1	Humana	M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F ²	Aumento de unión a FcRn	Aumento de semivida
IgG1	Humana	M428L/N434S ³	Aumento de unión a FcRn	Aumento de semivida
IgG1	Humana	E233P/L234V/L235A/?G23 _{4,5} + A327G/A330S/P331S	Reducción de unión a FcγRI	Reducción de ADCC y CDC
IgG1	Humana	S239D/S298A/I332E + S239D/A330L/I332E ⁶	Aumento de unión a FcγRIIIa	Aumento de ADCC
IgG1	Humana	S239D/I332E ⁷	Aumento de unión a FcγRIIIa	Aumento de ADCC
IgG1	Humana	S298A/E333A/K334A ⁸	Aumento de unión a FcγRIIIa	Aumento de ADCC
IgG1	Humana	E333A ⁹	Aumento de unión a FcγRIIIa	Aumento de ADCC y CDC
IgG1	Humana	P257I/Q311 ¹⁰	Aumento de unión a FcRn	Vida media sin cambio
IgG1	Humana	K326W/E333S ¹¹	Aumento de unión a C1q	Aumento de CDC
IgG1	Humana	S239D/I332E/G236A ¹²	Aumento de FcγRIIa/FcγRIIb ratio	Aumento de fagocitosis de macrófago
IgG1	Humana	K322A ⁸	Reducción de unión a C1q	Reducción de CDC
		N297S		Reducción de (abrogado) ADCC
		N297Q		Reducción de (abrogado) ADCC
		R292P + V305I +/- F243L ₁₃		Aumento de ADCC
		P247I/A339Q ¹⁴		Aumento de ADCC
IgG4	Humana	S228P ¹⁵	-	Reducción de intercambio del brazo Fab
IgG2a	Ratón	L235E + E318A/K320A/K322A ¹¹	Reducción de unión a FcγRI y C1q	Reducción de ADCC y CDC

* La posición de las mutaciones de los aminoácidos de Fc se define usando el Esquema de Numeración Eu, que difiere de la numeración en SEQ ID NO: 18 y 19 anteriores; véase Edelman *et al.*, 1969, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 63:78-85)

5 Referencias a la Tabla 1

1. Hinton *et al.*, 2004 *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6)
2. Vaccaro *et al.*, 2005 *Nat Biotechnol.* 23(10):1283-8)
3. Zalevsky *et al.*, 2010 *Nat. Biotechnology* 28(2):157-159
4. Armour KL. *et al.*, 1999. *Eur J Immunol.* 29(8):2613-24
5. Shields RL. *et al.*, 2001. *J Biol Chem.* 276(9):6591-604
6. Masuda *et al.*, 2007, *Mol Immunol.* 44(12):3122-31
7. Bushfield *et al.*, 2014, *Leukemia* 28(11):2213-21

8. Okazaki *et al.*, 2004, *J Mol Biol.*; 336(5): 1239-49
9. Idusogie *et al.*, 2000, *J Immunol.* 164(8):4178-84
- 5 10. Datta-Mannan A. *et al.*, 2007. *Drug Metab. Dispos.* 35: 86-94
11. Steurer W. *et al.*, 1995. *J Immunol.* 155(3):1165- 74
- 10 12. Richards *et al.* 2008 *Mol Cancer Ther.* 7(8):2517-27
13. US 7,960,512 B2
14. EP 2 213 683
- 15 15. Labrijn AF. *et al.*, 2009. *Nat Biotechnol.* 27(8):767-71.

En otra realización, la función efectora de la región Fc puede alterarse a través de la modificación de las porciones de carbohidrato dentro del dominio de CH2 en el mismo.

20 Por ejemplo, se sabe que los anticuerpos terapéuticos que carecen o que tienen pocos residuos de fucosa en la región Fc, pueden presentar una mejor actividad de ADCC en seres humanos (por ejemplo, véase Peipp *et al.*, 2008, *Blood* 112(6):2390-9, Yamane-Ohnuki y Satoh, 2009, *MAbs* 1(3):230-26, Iida *et al.*, 2009, *BMC Cancer* 9:58. Los polipéptidos de anticuerpo bajos en fucosa pueden ser producidos por expresión en células cultivadas en un medio que contiene un inhibidor de manosidasa, tal como kinfunensina (véase el Ejemplo I en lo siguiente).

25 Otros métodos para modificar la glucosilación de un anticuerpo en un formato bajo en fucosa incluyen el uso de la encima bacteriana GDP-6-desoxi-D-lixo-4-hexulosa reductasa en células no capaces de metabolizar ramnosa (por ejemplo usando la tecnología GlymaxX® de ProBioGen AG, Berlín, Alemania).

30 Otro método para crear anticuerpos bajos en fucosa es por inhibición o agotamiento de alfa-(1,6)-fucosiltransferasa en células productoras de anticuerpos (por ejemplo, usando la tecnología PoteHigent® CHOK1SV de Lonza Ltd, Basel, Suiza).

35 Como se indicó antes, los polipéptidos de anticuerpo de la invención pueden ejercer una acción inhibidora en la señalización de IL-1 (véase el Ejemplo E), ya sea además de o en ausencia de cualquier función efectora mediada por Fc.

En una realización, los polipéptidos de anticuerpo de la invención pueden ejercer una acción inhibidora en una o más citocinas adicionales (o alternativas) dentro de la superfamilia de IL-1, incluyendo, pero sin limitación, IL-33 y/o IL-36.

40 La Interleucina-33 (IL-33) induce linfocitos T auxiliares, mastocitos, eosinófilos y basófilos para producir citocinas de tipo 2. Esta citocina fue llamada previamente NF-HEV "factor nuclear (NF) en vérulas altamente endoteliales" (HEV) ya que originalmente fue identificado en esas células especializadas. La IL-33 media sus efectos biológicos al interactuar con los receptores ST2 (también conocidos como IL1RL1) y la proteína accesoria del receptor de IL-1 (IL1RAP), activando las moléculas intracelulares en las trayectorias de señalización de NF- κ B y MAP cinasa que impulsan la producción de citocinas de tipo 2 (por ejemplo, IL-5 y IL-13) de células Th2 polarizadas. Se cree que la inducción de citocinas de tipo 2 por IL-33 induce los cambios graves patológicos observados en los órganos mucosales después de la administración de IL-33.

45 50 La Interleucina-36 (IL-36) es una citocina que predominantemente actúa en los linfocitos T CD4+ sin modificar a través del receptor de IL-36. Se sabe que activan el NF- κ B y las proteínas cinasas activadas por mitógeno para jugar un papel en la patología de la piel. También se ha encontrado que activan la proliferación de linfocitos T y la liberación de IL-2.

55 55 Será apreciado por los expertos en la técnica que el polipéptido de anticuerpo de la invención puede inhibir la señalización de IL-1, IL-33 y/o IL-36 totalmente o en parte. Por ejemplo, la señalización puede ser inhibida por al menos 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 75 % o más con respecto a la señalización en la ausencia del polipéptido de la invención.

60 60 El grado de inhibición de la señalización de IL-1, IL-33 y/o IL-36 por el polipéptido de la invención puede ser determinado usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la inhibición de la señalización de IL-1 puede ser medida como se describe en el Ejemplo E en lo siguiente.

Del mismo modo, la inhibición de la señalización de IL-33 puede ser medida como se describe en el Ejemplo E.

65 65 La inhibición de la señalización de IL-36 puede ser medida por métodos conocido en la técnica. Por ejemplo, el

estímulo de IL-36 de fibroblastos sinoviales lleva a la activación de NF- κ B y MAP cinasa. Como alternativa, IL-36- α , - β y γ aumentan la proliferación de linfocitos T en respuesta al estímulo antiCD3/anti-CD28 (véase Vigne *et al.*, 2012, *Blood* 120(17):3478-87).

5 En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender además una porción para aumentar la semivida *in vivo* del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, tal como, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), albúmina de suero humano, grupos de glucosilación, ácidos grasos y dextrans. Esas porciones adicionales pueden ser conjugadas o combinadas de otro modo con la porción de unión usando métodos bien conocidos en la técnica.

10 10 Cualquiera o más de los siguientes métodos conocidos para mejorar la semivida de las proteínas puede usarse para este propósito:

15 (a) PEGilación

15 Un método ampliamente usado para mejorar la semivida de las proteínas es el enlace covalente de porciones de polietilenglicol (PEG) a la proteína. Los PEG son polímeros solubles en agua que debido a su gran volumen hidrodinámico crean una protección alrededor del fármaco pegilado (Molineux, G., "Pegylation: engineering improved pharmaceuticals for enhanced therapy". *Cancer Treat Rev*, 2002. 28 Supl A: pág. 13-6). Las proteínas pegiladas presentan una menor eliminación renal y proteólisis, menor toxicidad, menor inmunogenicidad y mayor solubilidad (Veronese, F. M. y J. M. Harris, "Introduction and overview of peptide and protein pegylation". *Adv Drug Deliv Rev*, 2002. 54(4): pág. 453-6., Chapman, A.P., "PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: a review". *Adv Drug Deliv Rev*, 2002. 54(4): pág. 531-45). La pegilación ha sido empleada para muchos fármacos a base de proteínas incluyendo las primeras moléculas pegiladas asparaginasa y adenosina desaminasa (Veronese, F.M. y J.M. Harris, "Introduction and overview of peptide and protein pegylation". *Adv Drug Deliv Rev*, 2002. 54(4): pág. 453-6., Veronese, F. M. y G. Pasut, "PEGylation, successful approach to drug delivery". *Drug Discov Today*, 2005. 10(21): pág. 1451-8)e.

30 Para obtener una proteína exitosamente pegilada, con una semivida aumentada al máximo y actividad biológica retenida, muchos parámetros que pueden afectar el resultado son importantes y deben tomarse en consideración. Las moléculas PEG pueden diferir, y las variantes de PEG que se han usado para la pegilación de proteínas incluyen PEG y monometoxi-PEG. Además, pueden ser ya sea lineales o ramificadas (Wang, Y.S., *et al.*, "Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications". *Adv Drug Deliv Rev*, 2002. 54(4): pág. 547-70). El tamaño de las moléculas de PEG usadas puede variar y las porciones de PEG que varían en tamaño entre 1 y 40 kDa han sido enlazadas a proteínas (Wang, Y.S., *et al.*, "Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications". *Adv Drug Deliv Rev*, 2002. 54(4): pág. 547-70., Sato, H., "Enzymatic procedure for site-specific pegylation of proteins". *Adv Drug Deliv Rev*, 2002. 54(4): pág. 487-504, Bowen, S., *et al.*, "Relationship between molecular mass and duration of activity of polyethyleneglycol conjugated granulocyte colony-stimulating factor mitein". *Exp Hematol*, 1999. 27(3): pág. 42532, Chapman, A.P., *et al.*, "Therapeutic antibody fragments with prolonged *in vivo* half-lives". *Nat Biotechnol*, 1999. 17(8): pág. 780-3). Además, el número de porciones PEG unidas a la proteína puede variar, y ejemplos de entre uno y seis unidades de PEG estando unidas a las proteínas han sido reportados (Wang, Y.S., *et al.*, "Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications". *Adv Drug Deliv Rev*, 2002. 54(4): pág. 547-70., Bowen, S., *et al.*, "Relationship between molecular mass and duration of activity of polyethyleneglycol conjugated granulocyte colony-stimulating factor mitein". *Exp Hematol*, 1999. 27(3): pág. 42532]. Además, se ha utilizado la presencia o ausencia de un enlazador entre PEG, así como varios grupos reactivos para conjugación. Por tanto, el PEG puede enlazarse a grupos amino de la terminal N, o a residuos de aminoácidos con grupos reactivos amino o hidroxilo (Lys, His, Ser, Thr y Tyr) directamente o usando ácido y-amino butírico como un enlazador. Además, el PEG puede acoplarse a grupos carboxilo (Asp, Glu, terminal C) o sulfhidrilo (Cys). Finalmente, los residuos Gln pueden ser específicamente pegilados usando la enzima transglutaminasa y se han descrito derivados de alquilamina de PEG (Sato, H., "Enzymatic procedure for site-specific pegylation of proteins". *Adv Drug Deliv Rev*, 2002. 54(4): pág. 487-504].

55 55 Se ha demostrado que aumentando el grado de pegilación da como resultado un aumento en la semivida *in vivo*. Sin embargo, será apreciado por los expertos en la técnica que el proceso de pegilación necesitará optimizarse para un polipéptido de anticuerpo particular en una base individual.

60 60 El PEG puede acoplarse a enlaces bisulfuro naturales como se describe en WO 2005/007197. Los enlaces bisulfuro pueden estabilizarse a través de la adición de un puente químico que no compromete la estructura terciaria de la proteína. Esto permite usar la selectividad del tiol de conjugación de los dos sulfuros que comprenden un enlace bisulfuro para crear un puente para la unión específica de sitio del PEG. De este modo, se evita la necesidad de diseñar residuos en un péptido para unión de las moléculas diana.

65 65 Varios copolímeros de bloque alternativos también pueden conjugarse covalentemente como se describe en el documento WO 2003/059973. Los conjugados poliméricos terapéuticos pueden mostrar mejores propiedades térmicas, cristalización, adhesión, hinchamiento, revestimiento, conformación y biodistribución dependiente del pH.

Además, pueden lograr una circulación prolongada, liberación del bioactivo en el entorno proteolítico y ácido del lisosoma secundario después de la captación celular del conjugado por pinocitosis y propiedades fisicoquímicas más favorables debido a las características de las moléculas grandes (por ejemplo, mayor solubilidad del fármaco en los fluidos biológicos). Los copolímeros de co-bloque, comprenden bloques hidrófilos e hidrófobos, que forman micelas poliméricas en solución. Con la disociación de las micelas, las moléculas individuales del copolímero de bloque se excretan de manera segura.

5 (b) Proteínas de Fusión

10 Cuando la invención comprende o reside en el uso de un imitador de anticuerpos (véase más arriba), los siguientes tipos de proteínas de fusión pueden ser útiles para prolongar la semivida *in vivo*.

15 *Proteínas de fusión de IgG*

20 Las moléculas de inmunoglobulina humana G (IgG) tienen semividas en circulación de aproximadamente 20 días. La porción Fc de las moléculas de IgG se han usado extensamente para la creación de proteínas de fusión que consisten en una parte de Fc y una proteína con un uso terapéutico. Esas proteínas de fusión presentan una semivida prolongada en comparación con sus contrapartes que carecen de Fc. Por ejemplo, esta estrategia se usó para el desarrollo de etanercept, un fármaco anti-reumático compuesto de una proteína de fusión entre el receptor del factor de necrosis de tumor p75 humano soluble y la porción Fc de IgG humana (Goldenberg, M. M., "Etanercept, a novel drug for the treatment of patients with severe, active rheumatoid arthritis". *Clin Ther*, 1999. 21(1): pág. 75-87; discusión 1-2].

25 Las proteínas enlazadas a Fc se producen al crear proteínas de fusión entre Fc y la región de unión a antígeno del polipéptido de interés por protocolos estándar de ingeniería genética. El grupo de Fc se fusiona al extremo C de la proteína de interés. Debido a la presencia de residuos de cisteína en la región de bisagra de IgG, las proteínas de fusión Fc se expresan como homodímeros enlazados a bisulfuro. Esto aumenta más su tamaño efectivo y semividas en circulación. Además, las construcciones homodiméricas pueden tener una mayor actividad funcional debido a una mejor avidez por su receptor / ligando en comparación con la correspondiente forma monomérica.

30 *Proteínas de fusión de albúmina de suero humano*

35 La albúmina de suero humano (ASH) es la proteína sanguínea natural más abundante en la circulación y tiene una semivida de 19 días [Osborn, B. L., *et al.*, "Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys". *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. 303(2): pág. 540-8]. Por tanto, la ASH es un socio de fusión adecuado para la creación de proteínas de fusión con mejor semivida. Las proteínas de fusión ASH presentan una semivida prolongada debido a la capacidad de la ASH de estabilizar la proteína hacia proteólisis y de aumentar el tiempo de residencia en el cuerpo (Veronese, F. M. y J. M. Harris, "Introduction and overview of peptide and protein pegylation". *Adv Drug Deliv Rev*, 2002. 54(4): pág. 453-6]. Las proteínas de fusión de ASH, incluyendo IL-2, IFN- α y - β y hormona de crecimiento (GH), se han producido y mostrado tener mejores propiedades farmacocinéticas. El albuferón (ASH-IFN- α) y la albutropina (ASH-GH) presentan semividas que son 18 y 6 veces más largas en monos macacos, respectivamente, que las contrapartes respectivas que carecen de un grupo ASH (Osborn, B. L., *et al.*, "Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys". *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. 303(2): pág. 540-8, Osborn, B.L., *et al.*, "Albutropin: a growth hormone-albumin fusion with improved pharmacokinetics and pharmacodynamics in rats and monkeys". *Eur J Pharmacol*, 2002. 456(1-3): pág. 149-58].

40 Las proteínas enlazadas a ASH se producen al crear proteínas de fusión entre ASH y la proteína de interés por protocolos estándar de ingeniería genética. El grupo ASH puede ser agregado ya sea en el extremo N o C. Ya que la modificación se agrega al extremo de la proteína, el riesgo de interferir con la estructura de la proteína y entonces con su función es considerablemente menor en comparación con las modificaciones tales como la pegilación al interior de la proteína. Además, la oportunidad de evitar la interferencia con el sitio activo de la proteína aumenta por el hecho de que el grupo ASH puede ser agregado en cualquiera del extremo N o C de la proteína de interés (Osborn, B.L., *et al.*, "Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys". *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. 303(2): pág. 540-8, Osborn, B. L., *et al.*, "Albutropin: a growth hormone-albumin fusion with improved pharmacokinetics and pharmacodynamics in rats and monkeys". *Eur J Pharmacol*, 2002. 456(1-3): pág. 149-58, Syed, S., K. E. Kelly, y W. P. Sheffield, "Inhibition of thrombin by hirudin genetically fused to wild-type or mutant antithrombin". *Thromb Res*, 1996. 84(6): pág. 419-29], dependiendo de cual es más probable que resulte en una proteína de fusión con actividad biológica mantenida. Por tanto, en el caso del albuferón y de la albutropina, el extremo C de la ASH se fusionó con el extremo N de IFN- α o GH, respectivamente, la creación de una proteína de fusión hirudina-ASH funcionalmente activa, el grupo ASH tuvo que ser fusionado al extremo C de hirudina. Estos resultados indican que las propiedades de la proteína diana determinan si la fusión en el extremo C o N es óptima.

45 (c) Glucosilación

50 La introducción de nuevos carbohidratos que contienen ácido siálico en una proteína (glico-ingeniería) ha demostrado

mejorar la semivida *in vivo*. Este método puede ser usado para proteínas naturalmente glicosiladas o para proteínas que normalmente carecen de glucosilación [Elliott, S., et al., "Enhancement of therapeutic protein *in vivo* activities through glycoengineering". *Nat Biotechnol*, 2003. 21(4): pág. 414-21].

5 La glucosilación de proteínas puede ser en la forma de carbohidratos enlazados a N o enlazados a O. Los carbohidratos enlazados a N normalmente están unidos a secuencias consenso (Asn-X-Ser/Thr) donde X es cualquier aminoácido excepto prolina. La O-glucosilación ocurre en los residuos Ser/Thr.

10 Para la producción de proteínas glucosiladas, puede requerirse la introducción de nuevos sitios de glucosilación. Para que ocurra la glucosilación, la expresión puede ser realizada en sistemas de células de levadura, insectos o mamíferos. Sin embargo, el patrón de glucosilación en las células de levadura es diferente que en las células de mamífero, generando proteínas hiper-glucosiladas, asociadas a un riesgo de mayor inmunogenicidad. En contraste, las células de insecto pueden preferirse ya que el patrón de glucosilación es similar a ese en las células de mamíferos mientras que los ciclos celulares son más cortos y por lo tanto es más rápido el proceso de expresión. Darbepoetin- α es un 15 ejemplo de una eritropoyetina humana modificada expresada en células CHO. Contiene dos sitios extra de N-glucosilación, resultando en una mejora de tres veces la semivida *in vivo* (Elliott, S., et al., "Enhancement of therapeutic protein *in vivo* activities through lycogengineering". *Nat Biotechnol*, 2003. 21(4): pág. 414-21].

20 Un método alternativo de glucosilación es la adición química de grupos de carbohidrato a las proteínas. En este método, la proteína se expresa desnuda, por ejemplo en *E. coli*. Después de la expresión y purificación, la proteína es glucosilada en un procedimiento completamente sintético libre de células. El método ofrece gran flexibilidad en términos de número, tamaño y tipo de carbohidrato a ser agregado.

(d) Acilación/miristoilación de ácido graso

25 Los ácidos grasos tienen una alta afinidad y alta capacidad de unión a ASH. Esta característica puede ser utilizada para mejorar la semivida de las proteínas. Por tanto, puede unirse un acilo graso a los aminoácidos de las proteínas, generando así las proteínas aciladas de acilo graso. Al alcanzar la circulación, el grupo acilo graso es capaz de unirse a la ASH circulante, resultando en una mejor semivida *in vivo* de la proteína.

30 Este método fue usado para el desarrollo de la Insulina detemir, que fue acilada con acilo graso con miristato en Lys^{B29} por tratamiento de insulina con ésteres de succinimida-ácido graso hidroxilo en dimetil formamida/DMSO [Kurtzhals, P., et al., "Albumin binding of insulins acylated with fatty acids: characterization of the ligand-protein interaction and correlation between binding affinity and timing of the insulin effect *in vivo*". *Biochem J*, 1995. 312 (Pt 3): pág. 725-31, 35 Hamilton-Wessler, M., et al., "Mechanism of protracted metabolic effects of fatty acid-acylated insulin, NN304, in dogs: retention of NN304 by albumin". *Diabetologia*, 1999. 42(10): pág. 1254-63]. Esto generó un análogo de insulina con aumento de la semivida *in vivo* debido a la unión de ASH.

(e) Dextrano

40 El dextrano resulta en una inmovilización de la proteína, resultando en una liberación lenta y mejora así la semivida de la proteína. El Dextrano-estreptocinasa, ha sido comercializado en Rusia para terapia trombolítica. Además, insulina, somatostatina (que se usa para terapia y diagnóstico de tumores que expresan receptores de somatostatina) y el fármaco inactivante de ribosoma tricosantina conjugado a dextrano, tuvo semividas apreciablemente mejoradas [Baudys, M., et al., "Extending insulin action *in vivo* by conjugation to carboxymethyl dextran". *Bioconjug Chem*, 1998. 9(2): pág. 176-83, Chan, W. L., et al., "Lowering of trichosanthin immunogenicity by site-specific coupling to dextran". *Biochem Pharmacol*, 1999. 57(8): pág. 927-34, Wulbrand, U., et al., "A novel somatostatin conjugate with a high affinity to LLA five somatostatin receptor subtypes". *Cancer*, 2002. 94(4 Supl): pág. 1293-7].

50 Además de los compuestos farmacéuticos a base de proteína, el dextrano ha sido usado para mejorar la semivida de antibióticos y fármacos citotóxicos [Yura, H., et al., "Synthesis and pharmacokinetics of a novel macromolecular prodrug of Tacrolimus (FK506), FK506-dextran conjugate". *J Control Release*, 1999. 57(1): pág. 87-99, Nakashima, M., et al., "In vitro characteristics and *in vivo* plasma disposition of cisplatin conjugated with oxidized and dicarboxymethylated dextrans". *Biol Pharm Bull*, 1999. 22(7): pág. 756-61, Kim, D. S., Y. J. Jung y. M. Kim, "Synthesis and properties of dextran-linked ampicillin". *Drug Dev Ind Pharm*, 2001. 27(1): pág. 97-101].

60 La conjugación del dextrano se realiza por aminación reductiva usando dextrano activado con periodato por el uso de bromuros de cianógeno [Wulbrand, U., et al., "A novel somatostatin conjugate with a high affinity to LLA five somatostatin receptor subtypes". *Cancer*, 2002. 94(4 Supl): pág. 1293-7, Kim, D. S., Y. J. Jung e Y. M. Kim, "Synthesis and properties of dextran-linked ampicillin". *Drug Dev Ind Pharm*, 2001. 27(1): pág. 97-101]. El dextrano usado puede variar en tamaño, y se ha usado el dextrano que varía de 9 a 82 kDa [Kim, D. S., Y. J. Jung e Y. M. Kim, "Synthesis and properties of dextran-linked ampicillin". *Drug Dev Ind Pharm*, 2001. 27(1): pág. 97-101, Behe, M., et al., "Biodistribution, blood half-life, and receptor binding of a somatostatin-dextran conjugate". *Med Oncol*, 2001. 18(1): pág. 59-64].

65 Además de mejorar la semivida de los fármacos, la conjugación del dextrano puede también reducir la

inmunogenicidad [Chan, W.L., *et al.*, "Lowering of trichosanthin immunogenicity by site-specific coupling to dextran". *Biochem Pharmacol*, 1999. 57(8): pág. 927-34].

Por tanto, en una realización del primer aspecto de la invención, el polipéptido de la invención es o comprende un polipéptido de "fusión".

Además de ser fusionado a una porción para mejorar las propiedades farmacocinéticas, será apreciado que el polipéptido de la invención puede también ser fusionado a un polipéptido tal como glutatión-S-transferasa (GST) o proteína A para facilitar la purificación de dicho polipéptido. Ejemplos de esas fusiones son bien conocidos a los expertos en la técnica. De modo similar, dicho polipéptido puede ser fusionado a una etiqueta de oligo-histidina, tal como His6, o a un epítopo reconocido por un anticuerpo tal como el bien conocido epítopo de etiqueta Myc. Las fusiones a cualquier variante o derivado de dicho polipéptido también se incluyen en el alcance de la invención. Será apreciado que las fusiones (o variantes, derivados o fusiones de los mismos) que retienen o mejoran las propiedades deseables, tales como las propiedades de unión a IL-1R o semivida *in vivo* son preferidos.

Por tanto, la fusión puede comprender una secuencia de aminoácidos como se detalla antes junto con una porción adicional que confiere un aspecto deseable en dicho polipéptido de la invención; por ejemplo, la porción puede ser útil en detectar o aislar el polipéptido, o promover la captación celular del polipéptido. La porción puede ser, por ejemplo, una porción de biotina, una porción radioactiva, una porción fluorescente, por ejemplo un fluoróforo pequeño o un fluoróforo fluorescente verde de proteína (GFP), como es bien sabido por los expertos en la técnica. La porción puede ser una etiqueta inmunogénica, por ejemplo una etiqueta Myc, como es sabido por los expertos en la técnica o puede ser una molécula lipófila o dominio de polipéptido que es capaz de promover la captación celular del polipéptido, como es sabido por los expertos en la técnica.

Será apreciado por los expertos en la técnica que los polipéptidos de anticuerpo de la invención pueden comprender o consistir en uno o más aminoácidos que han sido modificados o derivatizados.

Los derivados químicos de uno o más aminoácidos pueden lograrse por reacción con un grupo secundario funcional. Esas moléculas derivatizadas incluyen, por ejemplo, esas moléculas en las que los grupos amino libres han sido derivatizados para formar clorhidratos de amina, grupos p-toluen-sulfonilo, grupos carboxibenzoxy, grupos t-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxilo libres pueden ser derivatizados para formar sales, metil y etil ésteres u otros tipos de ésteres e hidrazidas. Los grupos hidroxilo libres pueden ser derivatizados para formar derivados de O-acilo o O-alquilo. También se incluyen como derivados químicos esos péptidos que contienen derivados naturales de aminoácidos de los veinte aminoácidos estándar. Por ejemplo: 4- hidroxiprolina puede ser sustituida por prolina; 5-hidroxilisina puede ser sustituida por lisina; 3- metilhistidina puede ser sustituida por histidina; homoserina puede ser sustituida por serina y ornitina por lisina. Los derivados también incluyen péptidos que contienen una o más adiciones o delecciones en tanto que se mantenga la actividad necesaria. Otras modificaciones incluidas son amidación, acilación del extremo amino (por ejemplo acetilación o amidación de ácido tioglicólico), amidación del extremo carboxilo (por ejemplo con amoníaco o metilamina), y modificaciones similares de los extremos.

Se apreciará además por los expertos en la técnica que también pueden ser útiles los compuestos peptidomiméticos. El término "peptidomimético" se refiere a un compuesto que imita la conformación y aspectos deseables de un péptido particular como un agente terapéutico.

Por ejemplo, dicho polipéptido incluye no solo moléculas en las que los residuos de aminoácidos se unen por enlaces peptídicos (-CO-NH-) sino también moléculas en las que se invierte el enlace peptídico. Esos peptidomiméticos retro-inversos pueden formarse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo tales como esos descritos en Meziere *et al* (1997) *J Immunol*. 159, 3230-3237. Este enfoque implica hacer pseudo-péptidos que contienen cambios que involucran la estructura principal, y no la orientación de las cadenas secundarias. Los péptidos retro-inversos, que contienen enlaces NH-CO en vez de enlaces peptídicos CO-NH, son mucho más resistentes a la proteólisis. Como alternativa, dicho polipéptido puede ser un compuesto peptidomimético en donde uno o más de los residuos de aminoácidos se enlaza por un enlace -y(CH₂NH)- en vez del enlace amida convencional.

En una alternativa adicional, el enlace peptídico puede ser dispensado con todo con la condición de que se use una porción enlazante adecuada que retenga la separación entre los átomos de carbono de los residuos de aminoácidos; puede ser ventajoso que la porción enlazante tenga sustancialmente la misma distribución de carga y sustancialmente la misma planaridad como un enlace peptídico.

Será también apreciado que dicho polipéptido puede convenientemente ser bloqueado en su extremo N o C para ayudar a reducir la susceptibilidad a la digestión exo-proteolítica.

También se ha usado varios aminoácidos sin codificar o modificados tales como D-aminoácidos y N-metil aminoácidos para modificar los péptidos de mamíferos. Además, puede establecerse una conformación bioactiva asumida por una modificación covalente, tal como ciclización o por incorporación de lactama u otros tipos de puentes, por ejemplo véase Weber *et al.*, 1978, *Proc Natl. Acad. Sci* EE.UU. 75:2636 y Thursell *et al.*, 1983, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*

111:166.

Los polipéptidos de anticuerpo de la invención pueden ser aumentados con una porción funcional para facilitar su uso destinado, por ejemplo como un agente de diagnóstico (por ejemplo formación de imágenes *in vivo*) o agente terapéutico. Por tanto, en una realización, el polipéptido de anticuerpo se enlaza, directa o indirectamente, a una porción terapéutica.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes comprende además una porción terapéutica (por ejemplo citotóxica).

Puede usarse cualquier porción terapéutica adecuada. Una porción terapéutica adecuada es una que es capaz de reducir o inhibir el crecimiento, o en particular eliminar, una célula de cáncer (o mastocitos o células progenitoras asociadas). Por ejemplo, el agente terapéutico puede ser una porción citotóxica. La porción citotóxica puede comprender o consistir en uno o más radioisótopos. Por ejemplo, el uno o más radioisótopos puede cada uno ser independientemente seleccionado del grupo que consiste en beta-emisores, emisores Auger, emisores de conversión de electrones, alfa-emisores, y emisores de energía de bajo contenido de fotones. Puede ser deseable que el uno o más radioisótopos tenga cada uno independientemente un patrón de emisión de energía absorbida localmente que crea una dosis absorbida alta en la vecindad del agente. Radioisótopos a modo de ejemplo pueden beta-emisores de intervalo largo, tales como ^{90}Y , ^{32}P , $^{186}\text{Re}/^{188}\text{Re}$; ^{166}Ho , $^{76}\text{As}/^{77}\text{As}$, ^{89}Sr , ^{153}Sm ; beta-emisores de intervalo medio, tales como ^{131}I , ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{161}Tb , ^{105}Rh ; beta-emisores de intervalo bajo, tales como ^{45}Ca o ^{35}S ; emisores de conversión o Auger, tales como ^{51}Cr , ^{67}Ga , ^{99}Tcm , ^{111}In , $^{114\text{m}}\text{In}$, ^{123}I , ^{125}I , ^{201}Tl ; y alfa-emisores, tales como ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{223}Ac , ^{225}Ac , ^{212}Pb , ^{255}Fm , ^{223}Ra , ^{149}Tb y ^{221}At . Están disponibles otros radionúclidos y será posibles para uso en terapia.

En una realización preferida, el polipéptido de anticuerpo está enlazado a (o etiquetado de otro modo con) el radioisótopo ^{177}Lu .

Como alternativa, la porción terapéutica puede comprender o consistir de uno o más fármacos terapéuticos (tales como citotóxicos), por ejemplo, un fármaco citostático; un fármaco anti-andrógeno; cortisona y derivados de los mismos; un fosfonato; un inhibidor de testosterona-5- α -reductasa; un adendo de boro; una citocina; tapsigargina y sus metabolitos; una toxina (tal como saporina o calicamicina); un agente quimioterapéutico (tal como un antimetabolito); o cualquier otro fármaco citotóxico terapéutico útil en el tratamiento de cánceres.

Fármacos a modo de ejemplo terapéuticos/citotóxicos pueden incluir por ejemplo:

- 35 • Citostáticos, en particular esos con efectos secundarios limitantes de dosis, incluyendo pero sin limitación a ciclofosfamida, clorambucil, ifosfamida, busulfano, lomustina, taxanos, fosfato de estramustina y otras mostazas de nitrógeno, antibióticos (incluyendo doxorubicina, calicamicinas y esperamicina), alcaloides vinca, azaridinas, compuestos que contiene platino, endostatina, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas, triazenos, análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina, enzimas, urea sustituida, derivados de metil-hidrazina, daunorubicina, aminas anfipáticas,
- 40 • Anti-andrógenos tales como flutamida y bicalutamida y metabolitos de los mismos;
- Cortisona y derivados de la misma;
- Fosfonatos tales como difosfonato y bufosfonato;
- Inhibidores de Testosterona-5- α -reductasa;
- 45 • Adendos de boro;
- Citocinas;
- Tapsigargina y sus metabolitos.

Como alternativa, la porción citotóxica puede comprender o consistir en una o más porciones adecuadas para uso en terapia de activación, tal como terapia de activación de fotones, terapia de activación de neutrones, terapia de electrones Auger inducida por neutrones, terapia de irradiación de sincrotrones o terapia de activación de fotones de rayos X de baja energía.

Por ejemplo, con los polipéptidos de anticuerpo de la invención habrá el potencial de usar radiación de sincrotrones (o rayos X de baja energía) para el avance de la radioterapia, enfocándose principalmente en la llamada radioterapia de activación de fotones (PAT), en donde la deposición de energía local de la irradiación externa de rayos X aumenta en el tejido de cáncer por la interacción con un agente previamente administrado dirigido a un tumor Z grande.

La realización de tratamiento PAT usa rayos X monocromáticos de una fuente de sincrotrones, tal como se ofrece por la línea de haz de luz biomédica ID17 en la Instalación de Radiación de Sincrotrones de Europa (ESRF) en Grenoble, y como se anticipa que estará disponible en el futuro en otras instalaciones tales como la nueva instalación de sincrotrones Sueca, Max-IV.

La investigación en "terapia de tumor de electrones Auger inducidos", a ser realizada en la próxima Fuente de Fragmentación Europea (ESS) en Lund, proporciona una realización adicional potencial de tratamiento. Los neutrones

- términos y semitérmicos producidos por el reactor se han usado por mucho tiempo para la Terapia de Captura de Neutrones de Boro, BNCT, tanto para experimentos preclínicos como para tratamiento de tumores cerebrales con las partículas alfa inducidas y el núcleo de retroceso (^7L) que da una alta energía absorbida localmente. Un enfoque similar es usar neutrones y moléculas adecuadas dirigidas a tumor marcadas con núcleos estables con una gran sección transversal para los neutrones. Los anticuerpos o péptidos pueden por ejemplo marcarse con Gadolinio estable (^{157}Gd) y actuar como la molécula diana para los neutrones que son capturados por el núcleo de Gd, llamada *Terapia de Captura de Neutrones por Gadolinio (GdNCT)*. Mediante las técnicas de Monte Carlo, la distribución de la dosis en el tumor y los tejidos circundantes se calcula como si resultara de γ -fotones, neutrones, retrocesos nucleares, así como los rayos X característicos, conversión interna y electrones Auger de gadolinio u otros elementos potenciales.
- Opcionalmente, el polipéptido de anticuerpo de la invención puede comprender además una porción detectable. Por ejemplo, una porción detectable puede comprender o consistir de un radioisótopo, tal como un radioisótopo seleccionado del grupo que consiste en $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{89}Zr , ^{123}I y ^{201}TI . Opcionalmente, el agente puede comprender un par de radionúclidos detectables y citotóxicos, tales como ^{86}Y / ^{90}Y o ^{124}I / ^{211}At . Como alternativa, el polipéptido de anticuerpo puede comprender un radioisótopo que es capaz de actuar simultáneamente en una manera multimodal como una porción detectable y también como una porción citotóxica para proporcionar los llamados "teragnósticos multimodales". Las porciones de unión pueden por tanto acoplarse a nanopartículas que tiene la capacidad de formación de imágenes múltiples (por ejemplo, SPECT, PET, MRI, Óptica, o Ultrasonido) junto con la capacidad terapéutica usando fármacos citotóxicos, tales como radionúclidos o agentes de quimioterapia.
- Como alternativa, la porción detectable puede comprender o consistir de un isótopo paramagnético, tal como un isótopo paramagnético seleccionado del grupo que consiste en ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{162}Dy , ^{52}Cr y ^{56}Fe .
- En el caso de que el polipéptido de anticuerpo comprenda una porción detectable, después la porción detectable puede ser detectable por una técnica de formación de imagen tal como formación de imagen SPECT, PET, MRI, óptica o de ultrasonido.
- Las porciones terapéuticas y/o detectables (tales como un radioisótopo, porción citotóxica o similares) pueden ser enlazadas directamente, o indirectamente, al anticuerpo o fragmento del mismo. Los enlazadores adecuados son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, grupos prostéticos, enlazadores no fenólicos (derivados de N-succimidil-benzoatos; dodecaborato), porciones quelantes tanto de quelantes macrocíclicos como de acíclicos, tales como derivados de ácido 1,4,7,10-tetraazacacidododecan-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), deferoxamina (DFO), derivados de ácido dietilenetriaminopentaacético (DTPA), derivados de ácido S-2-(4-Isotiocianatobencil)-1,4,7-triazaclicononano-1,4,7-triacético (NOTA) y derivados de ácido 1,4,8,11-tetraazacacidododecan-1,4,8,11-tetraacético (TETA), derivados de ácido 3,6,9,15-Tetraazabacicido[9.3.1]-pentadeca-1(15),11,13-trien-4-(S)-(4-isotiocianato-bencil)-3,6,9-triacético (PCTA), derivados de ácido 5-S-(4-Aminobencil)-1-oxa-4,7,10-triazaciclododecan-4,7,10-tris(acético) (DO3A) y otras porciones quelantes.
- Un enlazador preferido es DTPA, por ejemplo como se usa en ^{177}Lu -DTPA-[polipéptido de anticuerpo de la invención]. Un enlazador más preferido es deferoxamina, DFO, por ejemplo como se usa en ^{89}Zr -DFO-[polipéptido de anticuerpo de la invención].
- Sin embargo, será apreciado por los expertos en la técnica que algunos usos médicos de los polipéptidos de anticuerpo de la invención no requerirán la presencia de una porción citotóxica o de diagnóstico.
- Por tanto, cuando el efecto terapéutico del anticuerpo de la invención es mediado por la inhibición de la señalización de IL-1 (o señalización de IL-33 y/o IL-36), un puede ser adecuado un polipéptido de anticuerpo "desnudo". Por ejemplo, cuando el efecto terapéutico es mediado por un efecto directo del anticuerpo de la invención en células inmunes, por ejemplo para reducir inflamación, puede ser ventajoso para el anticuerpo carecer de cualquier actividad citotóxica.
- Como se discutió antes, los métodos para la producción de polipéptidos de anticuerpo de la invención son bien conocidos en la técnica.
- Convenientemente, el polipéptido de anticuerpo es o comprende un polipéptido recombinante. Los métodos adecuados para la producción de esos polipéptidos recombinantes son bien conocidos en la técnica, tales como la expresión en células hospedadoras procariotas o eucariotas (por ejemplo, véase Green y Sambrook, 2012, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 4^a edición, Cold Spring Harbor, Nueva York).
- Los polipéptidos de anticuerpo de la invención pueden también ser producidos usando un sistema de traducción *in vitro* disponible en el comercio, tal como un lisado de reticulocitos de conejo o lisado de germen de trigo (disponible de Promega). Preferiblemente, el sistema de traducción es un lisado de reticulocito de conejo. Convenientemente, el sistema de traducción puede ser acoplado a un sistema de transcripción, tal como el sistema de transcripción-traducción TNT (Promega). Este sistema tiene la ventaja de producir un transcripto de ARNm adecuado de un polinucleótido de ADN codificante en la misma reacción como en la traducción.
- Los expertos en la técnica apreciarán que los polipéptidos de anticuerpo de la invención pueden, como alternativa,

sintetizarse artificialmente, por ejemplo, usando técnicas de síntesis bien conocidas de fase líquida o fase sólida (tal como síntesis de péptido de fase sólida t-Boc o Fmoc).

5 Un segundo aspecto de la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del primer aspecto de la invención, o una cadena del polipéptido componente del mismo. Por "molécula de ácido nucleico" incluimos ADN (por ejemplo ADN genómico o ADN complementario) y moléculas de ARNm, que pueden ser mono o bicatenarias. Por "aislado" se entiende que la molécula de ácido nucleico no está ubicada o proporcionada de otro modo dentro de una célula.

10 En una realización, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los expertos en la técnica apreciarán que la molécula de ácido nucleico puede ser optimizada por codón para la expresión del polipéptido de anticuerpo en una célula hospedadora particular, por ejemplo para la expresión en células humanas (por ejemplo, véase Angov, 2011, *Biotechnol J* 6(6):650-659).

15 También se incluye dentro del alcance de la invención lo siguiente:

20 (a) un tercer aspecto de la invención proporciona un vector (tal como un vector de expresión) que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto de la invención;

25 (b) un cuarto aspecto de la invención proporciona una célula hospedadora (tal como una célula de mamífero, por ejemplo, célula humana o célula de ovario de hámster Chino, por ejemplo células CHOK1SV) que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto de la invención o un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención; y

30 (c) un quinto aspecto de la invención proporciona un método de formación de un polipéptido de anticuerpo de acuerdo con el primer aspecto de la invención que comprende cultivar una población de células hospedadoras de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención, en condiciones en las que dicho polipéptido se expresa, y aislando al polipéptido de las mismas.

35 Un sexto aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según el primer aspecto de la invención y un diluyente, vehículo, adyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable.

40 Los expertos en la técnica apreciarán que también pueden incluirse compuestos adicionales en las composiciones farmacéuticas, incluyendo, agentes quelantes tales como EDTA, citrato, EGTA o glutathiona.

45 Las composiciones farmacéuticas pueden ser preparadas en una manera conocida en la técnica que es suficientemente estable en almacenamiento y adecuada para la administración a seres humanos y animales. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden ser liofilizadas, por ejemplo a través de secado por congelamiento, secado por aspersión, enfriamiento por aspersión, o a través del uso de formación de partículas de formación supercrítica de partículas.

50 Por "farmacéuticamente aceptable" se quiere decir un material no tóxico que no disminuye la eficacia de la actividad de unión a IL1RAP del polipéptido de anticuerpo de la invención. Esos reguladores, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, son bien conocidos en la técnica (véase "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18^a edición, A. R Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990) y "handbook of Pharmaceutical Excipients", 3^a edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000)).

55 El término "regulador" pretende significar una solución acuosa que contiene una mezcla de ácido-base con el propósito de establecer un pH. Ejemplos de reguladores son Trizma, Bicina, Tricina, MOPS, MOPSO, MOBS, Tris, Hepes, HEPBS, MES, fosfato, carbonato, acetato, citrato, glicolato, lactato, borato, ACES, ADA, tartrato, AMP, ATMP, AMPSO, BES, CABS, cacodilato, CHES, DIPSO, EPPS, etanolamina, glicina, HEPPSO, imidazol, ácido imidazolelactico, PIPES, SSC, SSPE, POPSO, TAPS, TAPSO y TES.

60 El término "diluyente" pretende significar una solución acuosa o no acuosa con el propósito de diluir el polipéptido de anticuerpo en la preparación farmacéutica. El diluyente puede ser uno o más de salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol o aceites (tales como aceite de girasol, aceite de maíz, aceite de cacahuate, aceite de semilla de algodón o aceite de ajonjolí).

65 El término "adyuvante" pretende significar cualquier compuesto agregado a la formulación para aumentar el efecto biológico del polipéptido de anticuerpo de la invención. El adyuvante puede ser uno o más de sales de cinc, cobre o plata con diferentes aniones, por ejemplo, pero sin limitación a fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, tiocianato, sulfato, hidróxido, fosfato, carbonato, lactato, glicolato, citrato, borato, tartrato, y acetatos de diferente composición de acilo.

65 El adyuvante puede ser también polímeros catiónicos tales como éteres catiónicos de celulosa, ésteres catiónicos de celulosa, ácido hialurónico desacetilado, quitosán, dendrímeros catiónicos, polímeros catiónicos sintéticos tales como

polí(vinil imidazol), y polipéptidos catiónicos tales como polihistidina, polilisina, poliarginina, y péptidos que contienen esos aminoácidos.

El excipiente puede ser uno o más de carbohidratos, polímeros, lípidos y minerales. Ejemplos de carbohidratos incluyen lactosa, glucosa, sacarosa, manitol, y ciclodextrinas, que se agregan a la composición, por ejemplo para facilitar la liofilización. Ejemplos de polímeros son almidón, éteres de celulosa, celulosa carboximetilcelulosa, hidroxipropilmel celulosa, hidroxietil celulosa, etilhidroxietil celulosa, alginatos, carrageninas, ácido hialurónico y derivados del mismo, ácido poliacrílico, polisulfonato, polietilenglicol/óxido de polietileno, copolímeros de óxido de polietileno/óxido de polipropileno, alcohol polivinílico/acetato de polivinilo de diferentes grados de hidrólisis, y polivinilpirrolidona, todos de diferentes pesos moleculares, que son agregados a la composición, por ejemplo, para el control de viscosidad, para lograr la bioadhesión, o para proteger el lípido de degradación química o proteolítica. Ejemplos de lípidos son ácidos grasos, fosfolípidos, mono-, di-, y triglicéridos, ceramidas, esfingolípidos y glucolípidos, todos de diferente longitud de cadena de acilo y saturación, lecitina de huevo, lecitina de soya, lecitina hidrogenada de huevo y de soya, que son agregados a la composición por razones similares a esas para los polímeros. Ejemplos de minerales son talco, óxido de magnesio, óxido de cinc y óxido de titanio, que son agregados a la composición para obtener beneficios tales como la reducción de acumulación de líquido o propiedades ventajosas de pigmento.

Los polipéptidos de anticuerpo de la invención pueden ser formulados en cualquier tipo de composición farmacéutica conocida en la técnica que sea adecuada para el suministro de los mismos.

En una realización, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar en forma de un liposoma, en donde se combina el polipéptido de anticuerpo, además de otros vehículos farmacéuticamente aceptables, con agentes anfipáticos tales como lípidos, que existen en formas agregadas como micelas, monocapas insolubles y cristales líquidos. Los lípidos adecuados para la formulación liposomal incluyen, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfátidos, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares, y similares. Los lípidos adecuados también incluyen los lípidos antes modificados por poli(etilenglicol) en el grupo delantero polar para prolongar el tiempo de circulación en la corriente sanguínea. La preparación de esas formulaciones liposomales puede ser encontrada en, por ejemplo, el documento US 4.235.871.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden estar en la forma de microesferas biodegradables. Los poliésteres alifáticos, tales como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), copolímeros de PLA y PGA (PLGA) o poli(caprolactona) (PCL), y polianhídridos han sido usados ampliamente como polímeros biodegradables en la producción de microesferas. Las preparaciones de esas microesferas pueden encontrarse en los documentos US 5.851.451 y en EP 0 213 303.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas de la invención se proporcionan en la forma de geles de polímero, donde los polímeros tales como almidón, éteres de celulosa, celulosa carboximetilcelulosa, hidroxipropilmel celulosa, hidroxietil celulosa, etilhidroxietil celulosa, alginatos, carrageninas, ácido hialurónico y derivados de los mismos, ácido poliacrílico, polivinil imidazol, polisulfonato, polietilenglicol/óxido de polietileno, copolímeros de óxido de polietileno/óxido de polipropileno, alcohol polivinílico/acetato de polivinilo de diferente grado de hidrólisis, y polivinilpirrolidona se usan para espesar la solución que contiene el agente. Los polímeros pueden comprender también gelatina o colágeno.

Como alternativa, el polipéptido de anticuerpo puede simplemente disolverse en salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol o aceites (tales como aceite de cártamo, aceite de maíz, aceite de cacahuate, aceite de semilla de algodón o aceite de ajonjolí), goma de tragacanto, y/o varios reguladores.

Será apreciado que las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir iones y un pH definido para potenciación de la acción del polipéptido de anticuerpo activo. Además, las composiciones pueden ser sometidas a operaciones farmacéuticas convencionales tales como esterilización y/o puede contener adyuvantes convencionales tales como conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, reguladores, rellenos, etc.

Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden ser administradas a través de cualquier ruta adecuada conocida por los expertos en la técnica. Por tanto, las rutas de administración posibles incluyen parenteral (intravenosa, subcutánea, e intramuscular), tópica, ocular, nasal, pulmonar, bucal, oral, parenteral, vaginal y rectal. También es posible la administración de implantes.

En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas se administran parenteralmente, por ejemplo, por vía intravenosa, intracerebroventricular, intraarticular, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intraesternal, intracraneal, intramuscular o subcutánea, o pueden ser administradas por técnicas de infusión. Se usan convenientemente en la forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o glucosa para hacer la solución isotónica con la sangre. Las soluciones acuosas deben ser adecuadamente reguladas (preferiblemente a un pH de 3 a 9), si fuese necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas bajo condiciones estériles se efectúa fácilmente por técnicas farmacéuticas estándar bien conocidas por los expertos en la técnica.

- Las formulaciones para la administración parenteral incluyen soluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, reguladores de pH, bacteriostáticos y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del destinatario; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en envases de dosis unitaria o dosis múltiples sellados, por ejemplo, ampolletas y frascos y pueden ser almacenadas en una condición seca por congelamiento (liofilizada) que requiere únicamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Soluciones y suspensiones de inyección extemporáneas pueden prepararse de polvos estériles, gránulos y tabletas del tipo previamente descrito.
- 5 10 Por tanto, las composiciones farmacéuticas de la invención son especialmente adecuadas para administración parenteral, por ejemplo intravenosa.
- Como alternativa, las composiciones farmacéuticas puede ser administradas por vía intranasal o por inhalación (por ejemplo, en la forma de una presentación de rocío de aerosol de un recipiente presurizado, bomba, rocío o nebulizador 15 con el uso de un propulsor adecuado, tal como diclorodifluorometano, triclorofluoro-metano, diclorotetrafluoro-etano, un hidrofluoroalcano tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134A3 o 1,1,1,2,3,3-heptafluoropropano (HFA 227EA3), 20 bióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la dosis unitaria puede determinarse proveyendo una válvula para suministrar una cantidad medida. El contenedor presurizado, bomba, rociador o nebulizador puede contener una solución o suspensión del polipéptido activo, por ejemplo usando una mezcla de etanol y el propulsor como el solvente, que puede además contener un lubricante, por ejemplo trioleato de sorbitán. Las cápsulas y cartuchos (hechos, por ejemplo, de gelatina) para uso en un inhalador o insuflador pueden ser formuladas para contener una mezcla de polvo de un compuesto de la invención y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.
- 25 30 35 40 45 Las formulaciones en aerosol o polvo seco se disponen preferiblemente de modo que cada dosis medida o "carga" contenga al menos 1 mg de un compuesto de la invención para suministro al paciente. Será apreciado que la dosis diaria total con un aerosol variará de paciente a paciente, y puede ser administrado en una única dosis o, más usualmente, en dosis divididas en todo el día.
- Como alternativa, los polipéptidos de anticuerpo de la invención pueden ser administrados en la forma de un supositorio o pesario, o pueden aplicarse tópicamente en la forma de una loción, solución, crema, pomada o polvo fino. Los compuestos de la invención también pueden ser administrados por vía transdérmica, por ejemplo, mediante el uso de un parche para la piel. También pueden administrarse por la ruta ocular.
- Para uso oftálmico, los polipéptidos de anticuerpo de la invención pueden formularse como suspensiones micronizadas en salina isotónica, ajustada en pH, estéril, o, preferiblemente, como soluciones en salina isotónica, ajustada en pH, estéril, opcionalmente en combinación con un conservante tal como un cloruro de benzalconio. Como alternativa, pueden formularse en una pomada tal como petróleo.
- Para la aplicación tópica a la piel, el polipéptido de anticuerpo de la invención puede ser formulado como una pomada adecuada que contiene el compuesto activo suspendido o disuelto en, por ejemplo, una mezcla con uno o más de los siguientes: aceite mineral, petróleo líquido, petróleo blanco, propilenoglicol, compuesto de polioxietileno polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Como alternativa, pueden formularse como una loción o crema adecuada suspendida o disuelta en, por ejemplo, una mezcla de uno o más de lo siguiente: aceite mineral, monoestearato de sorbitán, un polietilenglicol, parafina líquida, polisorbato 60, cera de cetil ésteres, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.
- Las composiciones farmacéuticas serán administradas a un paciente en una dosis farmacéuticamente efectiva. Una "cantidad terapéuticamente efectiva", o "cantidad eficaz", o "terapéuticamente efectiva", como se usa en la presente, 50 55 60 65 se refiere a esa cantidad que proporciona un efecto terapéutico para una afección dada y régimen de administración. Esta es una cantidad predeterminada de material activo calculado para producir un efecto terapéutico deseado en asociación con el aditivo y diluyente requeridos, es decir, un vehículo o vehículo de administración. Además, se pretende significar una cantidad suficiente para reducir y más preferiblemente prevenir, un déficit clínicamente significativo en la actividad, función y respuesta del anfitrión. Alternativamente, una cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para causar una mejora en una afección clínicamente significativa en un anfitrión. Como se aprecia por los expertos en la técnica, la cantidad de un compuesto puede variar dependiendo de su actividad específica. Las cantidades de dosis adecuadas pueden contener una cantidad predeterminada de composición activa calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido. En los métodos y uso para la fabricación de las composiciones de la invención, se proporciona una cantidad terapéuticamente efectiva del componente activo. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede ser determinada por un médico o veterinario con experiencia ordinaria con base en las características del paciente, tal como edad, peso, sexo, condición, complicaciones, otras enfermedades, etc., como es bien conocido en la técnica. La administración de la dosis farmacéuticamente efectiva puede ser realizada tanto como una única administración en la forma de una unidad de dosis individual o como unidades de dosis más pequeñas y también por múltiples administraciones de dosis subdivididas en intervalos específicos. Como alternativa, la dosis puede proporcionarse como una infusión continua durante un período prolongado.

En el contexto del uso en diagnóstico de los polipéptidos de anticuerpo de la invención, una "cantidad farmacéuticamente efectiva", o "cantidad eficaz", o "diagnósticamente efectiva", como se usa en la presente, se refiere a esa cantidad que proporciona una señal detectable para el diagnóstico, por ejemplo para fines de formación de imagen *in vivo*.

5 Los polipéptidos de anticuerpo pueden ser formulados a varias concentraciones, dependiendo de la eficacia/toxicidad del polipéptido que se usa. Por ejemplo, la formulación puede comprender el polipéptido de anticuerpo activo a una concentración de entre 0,1 μ M y 1 mM, más preferiblemente entre 1 μ M y 500 μ M, entre 500 μ M y 1 mM, entre 300 μ M y 700 μ M, entre 1 μ M y 100 μ M, entre 100 μ M y 200 μ M, entre 200 μ M y 300 μ M, entre 300 μ M y 400 μ M, entre 400 μ M y 500 μ M, entre 500 μ M y 600 μ M, entre 600 μ M y 700 μ M, entre 800 μ M y 900 μ M o entre 900 μ M y 1 mM. Normalmente, la formulación comprende el polipéptido de anticuerpo activo a una concentración de entre 300 μ M y 700 μ M.

10 15 Normalmente, la dosis terapéutica del polipéptido de anticuerpo (con o sin una porción terapéutica) en un paciente humano estará en el intervalo de 100 μ g a 1 g por administración (con base en un peso corporal de 70kg, por ejemplo entre 300 μ g a 700 mg por administración). Por ejemplo, la máxima dosis terapéutica puede estar en el intervalo de 0,1 a 10 mg/kg por administración, por ejemplo entre 0,1 y 5 mg/kg o entre 1 y 5 mg/kg o entre 0,1 y 2 mg/kg. Será apreciado que esa dosis puede ser administrada a diferentes intervalos, como se determina por el oncólogo/médico; por ejemplo, una dosis puede ser administrada diariamente, dos veces a la semana, semanal, bisemanal o 20 mensualmente.

25 Será apreciado por los expertos en la técnica que las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas solas o en combinación con otros agentes terapéuticos usados en el tratamiento de cánceres, tales como antimetabolitos, agentes de alquilación, antraciclinas y otros antibióticos citotóxicos, alcaloides vinca, etopósido, compuestos de platino, taxanos, inhibidores de topoisomerasa I, inmunosupresores anti proliferativos, corticosteroides, hormonas sexuales y antagonistas de hormonas, y otros anticuerpos terapéuticos (tales como trastuzumab).

30 35 Será apreciado además por los expertos en la técnica que los polipéptidos y formulaciones farmacéuticas de la presente invención tienen utilidad tanto en los campos médicos como veterinarios. Por tanto, los métodos de la invención pueden ser usados en el tratamiento tanto de seres humanos como de animales (tales como caballos, perros y gatos). Preferiblemente, sin embargo, el paciente es un ser humano.

40 Para uso veterinario, un compuesto de la invención es administrado como una formulación convenientemente aceptable de acuerdo con la práctica veterinaria normal y el cirujano veterinario determinará el régimen de dosificación y la ruta de administración que será más apropiada para un animal particular.

45 Un séptimo aspecto de la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según el primer aspecto de la invención para uso en medicina.

50 55 En una realización, los polipéptidos de anticuerpo y formulaciones de la invención pueden ser usados para tratar pacientes o sujetos que sufren de o están en riesgo de sufrir una enfermedad o indicación para la cual IL1RAP es un biomarcador.

Por tanto, un octavo aspecto relacionado de la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según el primer aspecto de la invención para uso en inducir la muerte celular y/o inhibir el crecimiento y/o proliferación de células patológicas asociadas a un trastorno neoplásico en un sujeto, o mastocitos o células progenitoras del mismo, en donde las células expresan IL1RAP.

60 65 Un noveno aspecto relacionado además de la invención, proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según el primer aspecto de la invención para uso en el tratamiento y/o diagnóstico de un trastorno neoplásico en un sujeto, en donde el trastorno neoplásico se asocia a células que expresan IL1RAP.

Por "tratamiento" se incluye tanto tratamiento terapéutico como profiláctico del paciente. El término "profiláctico" se usa para abarcar el uso de un agente, o formulación del mismo, como se describe en la presente que ya sea previene o reduce la probabilidad de un trastorno neoplásico, o el esparramiento, diseminación, o metástasis de células de cáncer en un paciente o sujeto. El término "profiláctico" también abarca el uso de un agente, o formulación del mismo, como se describe en la presente para prevenir la recurrencia de un trastorno neoplásico en un paciente quién ha sido tratado previamente para el trastorno neoplásico.

Por "diagnóstico" incluimos la detección de células cancerosas, ya sea *in vivo* (es decir, dentro del cuerpo de un paciente) o *ex vivo* (es decir, dentro de un tejido o muestra de célula removida del cuerpo de un paciente).

70 75 Por "un trastorno neoplásico asociado a células que expresan IL1RAP" incluimos esos trastornos en donde las células patológicas que son responsables, directa o indirectamente, del trastorno expresan IL1RAP en la superficie celular. Será apreciado que las células que expresan IL1RAP pueden ser células de cáncer, por ejemplo células de tumor, en sí. Además, esas células incluyen mastocitos patológicos (es decir, mastocitos de cáncer o CSC) y células progenitoras que son responsables, directa o indirectamente, del desarrollo de un trastorno neoplásico en un individuo.

Ejemplos de CSC se revelan en Visvader y Lindeman, 2008, *Nat Rev Cancer* 8:755-768.

- Como alternativa, o además, las células que expresan IL1RAP pueden ser asociadas indirectamente al trastorno neoplásico, por ejemplo, pueden mediar los procesos celulares requeridos para que sobrevivan las células neoplásicas. El agente anticuerpo de la invención puede en este evento dirigirse a las células esenciales para el suministro sanguíneo del tumor (angiogénesis) o células que inhiben una respuesta inmune benéfica dirigida contra las malignas (por ejemplo macrófagos supresores o linfocitos T).
- Dependiendo de si es terapéuticamente deseable eliminar las células diana que expresan IL1RAP, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según el primer aspecto de la invención puede ser usado que es capaz de inducir ADCC. Por ejemplo, cuando las células diana de IL1RAP son células de cáncer (tales como células de LMC, LMA, LLA, melanoma, cáncer de pulmón, etc.) puede ser ventajoso para el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno ser capaz de inducir ADCC para eliminar esas células. Sin embargo, será apreciado que también puede lograrse un beneficio terapéutico usando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que carece de actividad de ADCC, por ejemplo a través de la inhibición de la señalización de IL-1 (o IL-33 o IL-36) llevando a una reducción en la angiogénesis en la vecindad de un tumor.

En una realización, el trastorno neoplásico es un trastorno neoplásico hematológico.

- Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser para uso en el tratamiento y/o diagnóstico de un trastorno neoplásico seleccionado del grupo que consiste en leucemia mieloide crónica (LMC), trastornos mieloproliferativos (TMP), síndrome mielodisplásico (SMD), leucemia linfoblástica aguda (LLA) y leucemia mieloide aguda (LMA).
- En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es para uso en el tratamiento y/o diagnóstico de un trastorno neoplásico asociado a la formación de tumores sólidos dentro del cuerpo del sujeto.
- Por tanto, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser para uso en el tratamiento de un trastorno neoplásico seleccionado del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, melanomas, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro/SNC, cáncer cervical, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de hígado, linfomas, cáncer de ovario, cáncer pancreático, y sarcomas.

- En relación a los aspectos terapéutico y profiláctico de la invención, será apreciado por los expertos en la técnica que la unión del polipéptido de anticuerpo a IL1RAP presente en la superficie de las células asociadas al trastorno neoplásico puede llevar a una modulación (es decir, un aumento o disminución) de una actividad biológica de IL1RAP. Sin embargo, ese efecto modulador no es esencial; por ejemplo, los polipéptidos de anticuerpo de la invención pueden producir un efecto terapéutico y profiláctico simplemente por virtud de unirse a IL1RAP en la superficie de las células asociadas al tumor sólido, que a su vez puede activar el sistema inmune para inducir la muerte celular (por ejemplo por ADCC y/o por la presencia dentro del agente de una porción citotóxica/radioactiva).

- Por "actividad biológica de IL1RAP" incluimos cualquier evento de interacción o señalización que involucra la IL1RAP en las células asociadas al trastorno neoplásico. Por ejemplo, en una realización el polipéptido de anticuerpo es capaz de bloquear la unión de uno o más correceptores a IL1RAP (tal como IL1R1, ST2, C-KIT y/o IL1RL2).
- Esa inhibición de la actividad biológica de IL1RAP por un polipéptido de anticuerpo de la invención puede ser en todo o en parte. Por ejemplo, el agente puede inhibir la actividad biológica de IL1RAP por al menos 10 %, preferiblemente al menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %, y lo más preferiblemente por 100 % en comparación con la actividad biológica de IL1RAP en células asociadas al trastorno neoplásico que no han sido expuestas al polipéptido de anticuerpo. En una realización preferida, el polipéptido de anticuerpo es capaz de inhibir la actividad biológica de IL1RAP por 50 % o más en comparación a la actividad biológica de IL1RAP en células asociadas al trastorno neoplásico que no han sido expuestas al polipéptido de anticuerpo.

- Del mismo modo, será apreciado que la inhibición del crecimiento y/o proliferación de las células asociadas al trastorno neoplásico puede ser en todo o en parte. Por ejemplo, el polipéptido de anticuerpo puede inhibir el crecimiento y/o proliferación de las células asociadas al trastorno neoplásico por al menos 10 %, preferiblemente al menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %, y lo más preferiblemente por 100 % en comparación al crecimiento y/o proliferación de células asociadas al trastorno neoplásico que no han sido expuestas al polipéptido de anticuerpo.

- Un décimo aspecto de la invención proporciona el uso de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según el primer aspecto de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento o diagnóstico de un trastorno neoplásico en un sujeto, en donde el trastorno neoplásico se asocia a células que expresan IL1RAP.

En una realización el trastorno neoplásico es un trastorno neoplásico hematológico.

- Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser para uso en el tratamiento y/o

diagnóstico de un trastorno neoplásico seleccionado del grupo que consiste en leucemia mieloide crónica (LMC), trastornos mieloproliferativos (TMP), síndrome mielodisplásico (SMD), leucemia linfoblástica aguda (LLA) y leucemia mieloide aguda (LMA).

- 5 En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es para su uso en el tratamiento y/o diagnóstico de un trastorno neoplásico asociado a la formación de tumores sólidos dentro del cuerpo del sujeto.

Por tanto, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser para uso en el tratamiento de un trastorno neoplásico seleccionado del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, 10 cáncer colorrectal, melanomas, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro/SNC, cáncer cervical, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de hígado, linfomas, cáncer de ovario, cáncer pancreático, y sarcomas.

15 Un undécimo aspecto de la invención proporciona un método para el tratamiento o diagnóstico de un trastorno neoplásico en un sujeto, que comprende el paso de administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según el primer aspecto de la invención, en donde el trastorno neoplásico se asocia a las células que expresan IL1RAP.

20 En una realización, el trastorno neoplásico es un trastorno neoplásico hematológico.

25 Por ejemplo, el método puede ser para uso en el tratamiento y/o diagnóstico de un trastorno neoplásico seleccionado del grupo que consiste en leucemia mieloide crónica (LMC), trastornos mieloproliferativos (TMP), síndrome mielodisplásico (SMD), leucemia linfoblástica aguda (LLA) y leucemia mieloide aguda (LMA).

30 En otra realización, el método es para su uso en el tratamiento y/o diagnóstico de un trastorno neoplásico asociado a la formación de tumores sólidos dentro del cuerpo del sujeto.

35 Por tanto, el método puede ser para uso en el tratamiento de un trastorno neoplásico seleccionado del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, melanomas, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro/SNC, cáncer cervical, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de hígado, linfomas, cáncer de ovario, cáncer pancreático, y sarcomas.

40 En otra realización, los polipéptidos de anticuerpo y formulaciones de la invención pueden ser usados para tratar pacientes o sujetos quienes sufren de o están en riesgo de sufrir una enfermedad o afección susceptible de tratamiento con un inhibidor de la señalización de IL-1 (o IL-33 o IL-36).

45 Por tanto, un duodécimo aspecto de la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según el primer aspecto de la invención para uso en el tratamiento de una enfermedad o afección susceptible de tratamiento con un inhibidor de señalización de IL-1.

50 Esas afecciones o estados de enfermedad son bien conocidos en la técnica (véase Dinarello *et al.*, 2012, *Nature Reviews* 11:633-652 y Dinarello, 2014, *Mol. Med.* 20 (supl. 1):S43- S58) e incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: Artritis reumatoide, todos los tipos de artritis juvenil incluyendo artritis idiopática juvenil de inicio sistémico (SOJIA), artrosis, síndrome autoinflamatorio familiar inducido por frío (FCAS), enfermedad de Muckle-Wells, enfermedad inflamatoria multisistémica de inicio neonatal (NOMID), fiebre Mediterránea familiar (FMF), síndrome de artritis piógena, pioderma gangrenoso y acné (PAPA), enfermedad de Still de inicio en el adulto, síndrome de hiper IgD, diabetes mellitus tipo 2, síndrome de activación de macrófagos, síndrome periódico asociado al receptor de TNF, enfermedad de Blau, espondilitis anquilosante, enfermedad de Sweets, artritis lúpica, enfermedad de Alzheimer, psoriasis, asma, ateroesclerosis, sarcoidosis, dermatitis atópica, lupus eritematoso sistémico, pénfigo ampolloso, diabetes mellitus tipo I, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, gastritis por *Helicobacter pylori*, enfermedad inflamatoria intestinal (incluyendo colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), Hepatitis C, lesión por isquemia-reperfusión, esclerosis múltiple, meningitis neisérica o neumocócica, tuberculosis, síndrome de Bechet, choque séptico, enfermedad de injerto contra huésped, asma, diabetes tipo I, enfermedad de Alzheimer, ateroesclerosis, leucemia de linfocitos T del adulto, mieloma múltiple, periodontitis, obesidad y enfermedades relacionadas con la obesidad (por ejemplo, síndrome metabólico, cardiomegalia, insuficiencia cardíaca congestiva, venas varicosas, síndrome del ovario poliquístico, enfermedad de reflujo gastroesofágico (GERD), enfermedad de hígado graso, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer uterino, insuficiencia renal crónica, accidente cerebrovascular e hiperuricemia), enfermedad del disco intervertebral, síndrome del intestino irritable, síndrome de Schnitzler, alergia/dermatitis atópica y gota.

55 60 También se cree que el bloqueo de la señalización de IL-1 es beneficioso en el tratamiento de infarto de miocardio. Un ensayo clínico extenso actualmente busca confirmar la eficacia del bloqueo del anticuerpo de IL1B (usando Canakinumab) después de infarto de miocardio (el ensayo CANTOS; véase Ridker *et al.*, 2011, *Am Heart Journal* 162(4):597-605).

65 65 Para esas indicaciones, será apreciado que un beneficio terapéutico puede también lograrse usando un anticuerpo o

fragmento de unión a antígeno que se une a IL1RAP y bloquea así la señalización de IL-1 (o IL-33 o IL-36) asociada a las células inmunes. Ese anticuerpo puede ser modificado para que carezca de actividad de ADCC.

5 Un decimotercer aspecto de la invención proporciona el uso de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según el primer aspecto de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o afección susceptible de tratamiento con un inhibidor de la señalización de IL-1 (o IL-33 o IL-36).

10 Un decimocuarto aspecto de la invención proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad o afección susceptible de tratamiento con un inhibidor de señalización de IL-1 (o IL-33 o IL-36) en un sujeto, que comprende el paso de administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según el primer aspecto de la invención.

15 Un decimoquinto aspecto de la invención proporciona un método para el tratamiento mediado por ADCC o aumento de una enfermedad o afección susceptible de tratamiento con un inhibidor de señalización de IL-1 (o IL-33 o IL-36) en un sujeto, que comprende el paso de administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según el primer aspecto de la invención capaz de inducir ADCC.

20 Un decimosexto aspecto de la invención proporciona un método *in vitro* para la detección de células de cáncer en un sujeto, el método comprende:

- 25 (a) proporcionar una muestra de células (por ejemplo, mastocitos de glóbulos blancos/células progenitoras o tejido de biopsia) de un sujeto a ser probado;
 (b) opcionalmente, extraer y/o purificar las células presentes en la muestra;
 (c) poner en contacto un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según el primer aspecto de la invención con células presentes en la muestra;
 (d) determinar si el polipéptido de anticuerpo se une a las células

en donde la unión del polipéptido de anticuerpo a las células indica la presencia de células de cáncer en el tejido de un sujeto.

30 Un decimoséptimo aspecto de la invención proporciona un método *in vitro* para identificar un paciente con cáncer quién podría beneficiarse del tratamiento con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según el primer aspecto de la invención, el método comprende:

35 (a) proporcionar una muestra de células de cáncer (por ejemplo mastocitos de glóbulos blancos/células progenitoras o tejido de biopsia) de un paciente a ser probado;
 (b) opcionalmente, extraer y/o purificar las células presentes en la muestra;
 (c) poner en contacto un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según el primer aspecto de la invención con células presentes en la muestra;
 (d) determinar si el polipéptido de anticuerpo se une a las células

en donde la unión del polipéptido de anticuerpo a las células de cáncer es indicativa de un paciente quién se podría beneficiar del tratamiento con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según el primer aspecto de la invención.

45 Los expertos en la técnica apreciarán que hay muchas maneras de realizar dicho ensayo. Por ejemplo, el inmunoensayo podría ser ya sea homogéneo o, más preferiblemente, heterogéneo. El ensayo podría también ser realizado en un formato ya sea competitivo o, más preferiblemente, uno no competitivo.
 En una realización, la expresión de IL1RAP en muestras de sangre (leucemia) o biopsias (tumores sólidos) de pacientes se mide usando citometría de flujo o inmunohistoquímica, con la expresión arriba de un valor de umbral siendo indicativo de un paciente quién podría beneficiarse del tratamiento con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según el primer aspecto de la invención.

55 En realizaciones preferidas de los métodos anteriores *in vitro*, el paso (d) se realiza por citometría de flujo, inmunohistoquímica o ELISA.

Sin embargo, pueden usarse otros ensayos adecuados para detectar las interacciones anticuerpo-antígeno *in vitro*.

60 Un decimoctavo aspecto de la invención proporciona un método para tratar a un paciente con cáncer, comprendiendo el método administrar a un sujeto identificado como que tiene cáncer usando un método según el decimosexto y decimoséptimo aspecto de la invención, un agente terapéutico efectivo en el tratamiento de dicho cáncer. En una realización, el agente terapéutico de ejemplo es un polipéptido de anticuerpo según el primer aspecto de la invención.

65 En una realización, el método comprende:

- (a) disponer una muestra de células (por ejemplo mastocitos de glóbulos

blancos/células progenitoras o tejido de biopsia) de un sujeto a ser probado para la presencia de células de cáncer que expresan IL1RAP arriba de un criterio de umbral usando un método según el decimosexto o decimoséptimo aspecto de la invención;

- 5 (b) seleccionar para el tratamiento a sujetos cuya muestra de células probadas en el paso (a) contiene células de cáncer con expresión de IL1RAP arriba de un criterio de umbral; y
 (c) administrar al sujeto seleccionado en el paso (b) un agente terapéutico efectivo en el tratamiento de dicho cáncer, por ejemplo un polipéptido de anticuerpo según el primer aspecto de la invención.

En una realización relacionada, el método comprende:

- 10 (a) obtener una muestra de células (por ejemplo, mastocitos de glóbulos blancos/células progenitoras o tejido de biopsia) de un sujeto
 (b) probar dichas células para la presencia de células de cáncer que expresan IL1RAP arriba de un criterio de umbral usando un método según el decimosexto o decimoséptimo aspecto de la invención;
 15 (c) seleccionar para el tratamiento a sujetos cuya muestra de células probadas en el paso (b) contiene células de cáncer con expresión de IL1RAP arriba de un criterio de umbral; y
 (d) administrar al sujeto seleccionado en el paso (c) un agente terapéutico efectivo en el tratamiento de dicho cáncer, por ejemplo un polipéptido de anticuerpo según el primer aspecto de la invención.

- 20 Las preferencias y opciones por un aspecto, característica o parámetro dado de la invención deben, a menos que el contexto lo indique de otro modo, ser considerado como revelado en combinación con cualquiera y todas las preferencias y opciones para todos los otros aspectos, características y parámetros de la invención. Por ejemplo, en una realización de la invención se proporciona un anticuerpo IgG1 intacto que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16 para uso en el tratamiento de LMA.

25 La enumeración o exposición de un documento aparentemente publicado antes en esta memoria descriptiva, no debe considerarse necesariamente como un reconocimiento de que el documento forma parte del estado de la técnica o es de conocimiento general común.

30 30 El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa junto con el término "comprende" en las reivindicaciones y/o la especificación puede significar "uno," pero también es consistente con el significado de "uno o más," "al menos uno," y "uno o más que uno."

35 Estas y otras realizaciones de la invención se apreciarán y comprenderán mejor cuando se consideren junto con la descripción anterior y los dibujos adjuntos. Sin embargo, debe entenderse, que la descripción anterior, aunque indica varias realizaciones de la invención y numerosos detalles específicos de la misma, se da a modo de ilustración y no de limitación. Pueden hacerse muchas sustituciones, modificaciones, adiciones y/o reorganizaciones dentro del alcance de la invención sin apartarse del espíritu de la misma, y la invención incluye todas esas sustituciones, 40 modificaciones, adiciones y/o reorganizaciones.

45 Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede ser comprendida mejor con referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en la presente.

45 **Figura 1.** Unión del anticuerpo a modo de ejemplo en una ELISA indirecta a IL-1RAP humana. Se encontró que el anticuerpo a modo de ejemplo de la invención, CAN04, posee la afinidad más alta para IL-1RAP humana.

50 **Figuras 2.** Unión del anticuerpo a modo de ejemplo de la invención (CAN04) a células de LMC y LMA humana. (A) El gráfico muestra el valor de MFI para las células KU812 teñidas con anticuerpos monoclonales direccionalizados a IL1RAP a una concentración de 0,1 µg/ml, y revela que CAN04 tiene el valor de MFI más alto de los anticuerpos comparados. (B) El CAN04 muestra unión específica a cinco muestras de LMA primaria. (C) En tres muestras de LMC primaria, CAN04 muestra unión específica.

55 **Figura 3.** Las variantes humanizadas a modo de ejemplo del anticuerpo CAN04 se unen todas a las células BV173 que expresan IL1RAP, con la variante 6 mostrando la intensidad fluorescente media más alta.

Figuras 4. La capacidad del anticuerpo a modo de ejemplo CAN04 para bloquear la señalización de (A) IL-1 β (B) IL-1 α , y (C) IL-33.

60 **Figura 5.** La expansión celular total de las células de LMC primitivas primarias en presencia de IL1b se reduce apreciablemente con el anticuerpo CAN04 a modo de ejemplo en comparación tanto con el control como con un anticuerpo de referencia. El gráfico muestra el resultado combinado de tres muestras individuales del paciente normalizadas al control que consiste en cultivar sin anticuerpo o con anticuerpo de isotipo de control.

65 **Figuras 6.** El ensayo *in vitro* de ADCC muestra que el anticuerpo CAN04 a modo de ejemplo induce la eliminación celular específica de las células de LMC. (A) Las células KU812, LAMA84, y BV173 fueron eliminadas específicamente por adición de 0,1 µg/ml de CAN04. (B) La eliminación celular mediada por el anticuerpo CAN04

5 a modo de ejemplo es dependiente de la dosis como se muestra en las células diana BV173. **(C)** La eliminación celular de las células primarias de dos pacientes con crisis blástica de LMC se indujo por 1 μ g/ml de CAN04. **(D)** Las células de un tercer paciente con crisis blástica de LMC portando la mutación T315I fueron sensibles al efecto de ADCC mediado por CAN04. Cada experimento se realizó al menos dos veces con células NK de diferentes donadores, y los datos presentados muestran un experimento representativo de cada uno.

10 **Figura 7.** El ensayo *in vitro* de ADCC muestra que el anticuerpo CAN04 a modo de ejemplo es eficiente para inducir eliminación celular específica de células de melanoma (línea celular SKMEL5). A todas las concentraciones probadas, tan poco como 0,1 μ g/ml de CAN04 muestra una alta eliminación específica. El experimento se realizó al menos dos veces con células NK de diferentes donadores, y los datos presentados muestran un experimento representativo.

15 **Figuras 8 (A)** Imágenes confocales (una sección óptica, aproximadamente 0,9 μ m de espesor) mostrando las células LAMA incubadas por 2 horas con anticuerpos conjugados de CAN04-AF488 (verde) en hielo, o a 37 °C por 2 horas, o siendo incubadas con anticuerpos conjugados de CAN04-AF488 (verde) por 16 horas a 37 °C. Un anticuerpo definido claramente que se une a la membrana celular de la mayoría de las células puede ser observado después de 2 horas de incubación en hielo ("Hielo 2h"). Después de la incubación por 2 horas con los anticuerpos conjugados de CAN04-AF488 (verde) a 37 °C, además de la unión a la membrana, los anticuerpos comenzaron a entrar a las células (internalización) y ahora se localizan también en el citosol. Después de 16 horas de incubación a 37 °C, la unión a la membrana celular aún está presente y la internalización del anticuerpo ha producido la acumulación de anticuerpos de CAN04- AF488 en la mayoría de las células. La barra de escala (imagen derecha) representa 20 μ m en todas las imágenes. **(B)** Control para la unión específica de CAN04 e internalización: Las imágenes confocales (una sección óptica, aproximadamente 0,9 μ m de espesor) muestra las células LAMA incubadas con anticuerpo de isotipo de control conjugado a AF488 en hielo o a 37 °C por 2 horas, o a 37 °C por 16 horas. El anticuerpo de isotipo de control no mostró unión específica en cualquiera de estas condiciones. Se apreció una unión menor a desechos celulares y células necróticas (verde claro). La barra de escala (imagen derecha) representa 20 μ m en todas las imágenes.

20

25

30 **Figuras 9.** El tratamiento con CAN04 redujo apreciablemente la carga de leucemia. **(A)** La frecuencia de las células leucémicas en la sangre periférica fue menor en ratones tratados con el anticuerpo CAN04 a modo de ejemplo en comparación al isotipo de control en el día 36 después del trasplante (1,2 % contra 22,7 %, $p<0,0001$). **(B)** El conteo de plaquetas (PLT) permaneció a niveles normales con el CAN04 ($p=0,0001$). **(C)** Al momento del sacrificio la frecuencia de las células leucémicas en la médula ósea se redujo con CAN04 (38,7 % contra 91,5 %; $p<0,0001$). **(D)** La frecuencia de las células leucémicas en el bazo fue menor en los ratones tratados con CAN04 en comparación al isotipo de control (27,6 % contra 70,4 %; $p = 0,0063$).

35

40 **Figuras 10.** El efecto de la baja fucosa y mutaciones de Fc en la actividad de ADCC, como se determina usando células SKMEL5. **(A)** Actividad de ADCC en SKMEL-5 de CAN04 (Fc-1) con fucosa normal, CAN04 (Fc-1) con baja fucosa, Fc-4 y Fc-7. **(B)** Actividad de ADCC en SKMEL-5 de CAN04 (Fc-1) con fucosa normal, CAN04 (Fc-1) con baja fucosa, Fc-2 y Fc-3. **(C)** Actividad de ADCC en SKMEL-5 de CAN04 (Fc-1) con fucosa normal, CAN04 (Fc-1) con baja fucosa, Fc-5, Fc-6 y Fc-8.

Ejemplos

EJEMPLOS***A. Afinidad de unión de los anticuerpos a modo de ejemplo de la invención para la proteína IL1-RAP***5 (i) *Estudio de Biacore - anticuerpos anti-IL1RAP de origen de murino***Materiales y Métodos**

10 Se inmovilizó IgG cabra anti-ratón en una placa CM5 según el manual técnico del kit de captura y principio de operación estándar de BiACore T200 (Biacore Life Sciences, GE Healthcare Europe GmbH, Uppsala, Suecia).

El ciclo de análisis de unión consistió de tres pasos: (i) captura del ligando en la superficie de la placa por el anticuerpo anti-ratón inmovilizado; (ii) unión del analito al ligando capturado; y (iii) disociación del analito unido.

15 La superficie de la molécula de captura se regeneró después de cada ciclo de unión usando las condiciones recomendadas por el fabricante.

Todos los ciclos de unión se realizaron a 25 °C.

20 Después de cinco ciclos de arranque, cada anticuerpo (100 nM) se inyectó a un caudal de flujo de 30 μ l/min, durante 120 s, al comienzo del ciclo; después el analito (100 nM) se inyectó a una velocidad de flujo de 30 μ l/min, durante 120 s, seguido por el monitoreo de la fase de disociación por 300 s.

25 Un anticuerpo a modo de ejemplo de la invención (CAN04) se probó junto con dos anticuerpos anti-IL1RAP comparadores (CAN01 y CAN03).

Resultados y Conclusiones

Los resultados se muestran en la Tabla 2 siguiente:

30

Tabla 2 Medición de K_{on} , K_{off} y K_D			
Anticuerpo	ka (1/M·s)	Kd (1/s)	KD (M)
CAN01	2,34E+05	3,35E-04	1,43E-09
CAN03	2,26E+05	7,25E-05	3,21E-10
CAN04	4,27E+05	4,72E-05	1,10E-10

El anticuerpo a modo de ejemplo de la invención, CAN04, presentó la afinidad más alta por la IL1RAP humana.

35 (ii) *Estudio de ELISA - anticuerpos anti-IL1RAP de origen de murino***Materiales y Métodos**40 Se realizó un ensayo ELISA indirecto. Todas las muestras se analizaron por duplicado. Placas Nunc-MaxiSorp 96 Micro Well™ se revistieron con 100 ng de hIL1RAP 21-367 recombinante (100 μ l/pocillo) diluido en PBS 0,01 M, pH 7,4, e incubado durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron con regulador de lavado de ELISA (PBS 0,01 M, 0,05 % de Tween 20, pH 7,4) seguido por un paso de bloqueo usando 150 μ l/pocillo de solución de bloqueo de ELISA (PBS, 0,5 % de BSA, 0,05 % de Tween 20, pH 7,4). Despues de 1 h de incubación a temperatura ambiente (TA) en agitación las placas se lavaron de nuevo usando regulador de lavado de ELISA. Las muestras se diluyeron en una dilución serial45 de tres veces (variando de 1000 ng/ml a 0,5 ng/ml) en solución de bloqueo de ELISA y después se transfirieron a la placa de ELISA, 100 μ l/pocillo. Las placas se incubaron a TA por 1 h en agitación y después se lavaron con solución de lavado de ELISA. 100 μ l/pocillo de IgG conejo anti-ratón IgG conjugado a Fosfatasa Alcalina (DAKO, 1:1000) se agregó y se incubó 1 hora a TA en agitación. Las placas se lavaron seguido por adición de sustrato (sal disódica hexahidratada de 4-Nitrofenil fosfátido, SIGMA, 1 mg/ml), 100 μ l/pocillo. Despues las placas se incubaron a TA en agitación y se midió la absorbancia a 405 nm consecutivamente por 30 min. La absorbancia a 0 min se tomó como señal de fondo.

50 55 Los resultados se muestran en la Figura 1.

Se encontró que el anticuerpo a modo de ejemplo de la invención, CAN04, posee la afinidad más alta para la unión a IL-1RAP humana.

(iii) Estudio de ELISA - versiones humanizadas del anticuerpo "CAN04" a modo de ejemplo

Materiales y Métodos

5 Los dominios variables de cadena pesada y ligera de diecisésis variantes humanizadas de CAN04 (hCAN04) se subclonaron en vectores con dominios constantes humanos:

- El dominio constante kappa por el dominio VL [SEQ ID NO:18]
- La constante de cadena pesada de IgG1za por el dominio VH [SEQ ID NO:19]

10 Los anticuerpos se expresaron transitoriamente en células CHOK1SV en un volumen de 200 ml (matraz de agitación).

Los anticuerpos se purificaron usando cromatografía de afinidad de la Proteína A.

15 Los anticuerpos purificados se analizaron por SDS-PAGE y SE-HPLC.

Se realizó un ensayo ELISA indirecto como se describió antes con la alteración de que las muestras se diluyeron en una dilución serial de tres veces iniciando a 3,5 nM y corridas en réplicas de cuatro.

Resultados y Conclusiones

20 Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Afinidad hacia hIL1RAP determinada mediante ELISA

Anticuerpo	Cadena pesada*	Cadena ligera**	K_D (pM)
CAN04 (murino)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	88 ± 2
hCAN04 Variante 1	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 15	125 ± 2
hCAN04 Variante 2	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 15	171 ± 4
hCAN04 Variante 3	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 15	450 ± 68
hCAN04 Variante 4	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 15	470 ± 50
hCAN04 Variante 5	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 16	135 ± 2
hCAN04 Variante 6	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 16	173 ± 4
hCAN04 Variante 7	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 16	526 ± 44
hCAN04 Variante 8	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 16	402 ± 64
hCAN04 Variante 9	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 17	210 ± 4
hCAN04 Variante 10	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 17	301 ± 5
hCAN04 Variante 11	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 17	504 ± 26
hCAN04 Variante 12	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 17	620 ± 68

* La cadena pesada también comprendió los dominios constantes de cadena pesada de IgG1za [SEQ ID NO: 19].

** La cadena ligera también comprendió un dominio constante kappa [SEQ ID NO: 18].

25 Cuatro de las diecisésis versiones humanizadas de CAN04 mostraron unión mínima o ninguna unión a IL1RAP (no se muestran los datos).

B. Unión de anticuerpos a modo de ejemplo de la invención a células que expresan IL1RAP

30 (i) Estudio de citometría de flujo - anticuerpos anti-IL1RAP de origen de murino

Materiales y Métodos

35 Células KU812 de la línea celular de leucemia mieloide crónica (LMC) se tiñeron con anticuerpos criados contra IL1RAP o un isotipo de control relevante. Para la detección, se usó un anti-mlg-APC secundario.

Un anticuerpo a modo de ejemplo de la invención (CAN04) se probó junto con siete anticuerpos comparadores anti-IL1RAP (CAN01, CAN02, CAN03, CAN05, CAN07, CAN08 y CAN09). También se incluyó un anticuerpo de isotipo de control negativo.

40 Para el análisis de las células leucémicas primarias, tres muestras de paciente con LMC enriquecidas con CD34 y

cinco muestras de paciente con leucemia mieloide aguda (LMA) enriquecidas por células mononucleares se tiñeron con CAN04-PE a concentraciones de 1 µg/ml y 5 µg/ml respectivamente, o un isotipo de control conjugado a PE. Las células se analizaron usando un citómetro de flujo FACS CANTO (BD).

5 Resultados y Conclusiones

La tinción de las células leucémicas KU812 que expresan IL1RAP revela una mayor intensidad de fluorescencia media (MFI) para CAN04 en comparación al isotipo de control y otros anticuerpos comparadores dirigidos a IL1RAP (Figura 2A). El marcado de las células primarias de cinco LMA y tres LMC pacientes usando CAN04 resultó en la tinción arriba del isotipo de control en los análisis de citometría de flujo (Figuras 2B a 2C). El presente estudio muestra que CAN04 se une específicamente a IL1RAP con una mayor MFI que otros anticuerpos monoclonales en una línea celular de LMC, y que CAN04 también se une a las células primarias de LMC y LMA.

(ii) *Estudio de citometría de flujo - versiones humanizadas del anticuerpo "CAN04"*

15 Materiales y Métodos

Células BV173 de la línea celular de leucemia mieloide crónica (LMC) se tiñeron con 1 µg/ml de anticuerpo de prueba o un isotipo de control relevante. Para la detección, se usó un anti-hIgG-PE secundario. Las células se analizaron usando un citómetro de flujo FACS CANTO (BD).

20 Los anticuerpos de prueba incluyeron un anticuerpo quimérico anti-IL1RAP ("quimario") y doce versiones diferentes humanizadas del anticuerpo a modo de ejemplo CAN04 de la invención ("Vari" a "Var 12").

25 Resultados y Conclusiones

La tinción de las células leucémicas BV173 que expresan ILiRAP muestra que las variantes humanizadas de CAN04 se tiñen con diferente intensidad, pero a todos niveles por arriba del isotipo de control (véase la Figura 3. Las variantes humanizadas 1, 2, 5, 6, 9 y 10 de CAN04 (véase la Tabla 3) presentan el marcate más fuerte.

30 **C Mapeo de epítopo / dominio de los anticuerpos a modo de ejemplo de la invención**

Materiales y Métodos

35 Para comprender donde se unen los diferentes clones de anticuerpo en el IL1RAP, se realizó un análisis estructural de la proteína revelando que la parte extracelular del receptor podría dividirse en tres distintos dominios en lo siguiente llamados dominios 1, 2 y 3 (D1, D2, D3) (véase Wang *et al.*, 2010, *Nature Immunology*, 11:905-912). Para determinar el patrón de unión al dominio por los diferentes clones de anticuerpos, se generó una serie de construcciones del receptor y la unión a estos se probó en un ensayo ELISA.

40 Se realizó un ensayo ELISA indirecto. Todas las muestras se analizaron por duplicado. Placas Nunc-MaxiSorp 96 Micro Well™ se revistieron con 100 ng de Rec hIL1RAP Domain123 (aa21-367) (control positivo), Rec hIL1RAP Domain12 (aa21-234), Domain1 (aa21-134) o Rec hIL1RAP Domain3 (aa235-367) (100 µl/pocillo) diluido en PBS 0,01 M, pH 7,4, y se incubaron durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron con regulador de lavado de ELISA (PBS 0,01 M, 0,05 % Tween 20, pH 7,4) seguido por un paso de bloqueo usando 150 µl/pocillo de solución de bloqueo de ELISA (PBS, 0,5 % de BSA, 0,05 % de Tween 20, pH 7,4). Después de 1 h de incubación a temperatura ambiente (TA) en agitación las placas se lavaron de nuevo usando regulador de lavado de ELISA. CAN01, CAN03, CAN04, CAN05, CAN07, CAN08 y KMT-1 (*control positivo*) se diluyeron en dilución serial de tres veces (variando de 1000 ng/ml a 0,5 ng/ml) en solución de bloqueo de ELISA y después se transfirieron a la placa de ELISA, 100 µl/pocillo. Las placas se incubaron a TA por 1 h en agitación y después se lavaron con solución de lavado de ELISA. 100 µl/pocillo de IgG conejo anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina (DAKO, 1:1000) se agregó y se incubó 1 hora a TA en agitación. Las placas se lavaron seguido por la adición de sustrato (sal disódica hexahidratada de 4-Nitrofenil fosfátilo, SIGMA, 1 mg/ml), 100 µl/pocillo. Después las placas se incubaron a TA en agitación y se midió la absorbancia a 405 nm consecutivamente por 30 min. La absorbancia a 0 min se tomó como señal de fondo.

55 Un anticuerpo a modo de ejemplo de la invención (CAN04) se probó junto con nueve anticuerpos monoclonales anti-IL1RAP comparadores (CAN01, CAN02, CAN03, CAN05, CAN07, CAN08, CAN10, y CAN11, junto con un anticuerpo policlonal anti-IL1RAP (KMT-1) como un control positivo.

60 Resultados y Conclusiones

Una mayoría de los anticuerpos anti-IL1RAP probados para validación de diana se unieron al dominio 3 (D3). Sin embargo, el anticuerpo a modo de ejemplo CAN04 de la invención es distinto en que se une al dominio 2 (D2). Los datos completos del mapeo del dominio se encuentran resumidos en la Tabla 4 siguiente.

Tabla 4
Mapeo de epítopo de los clones del anticuerpo a modo de ejemplo anti-IL1RAP

Clon	Dominio123 (aa21-367)	Dominio12 (aa21-234)	Dominio1 (aa21-134)	Dominio3 (aa235-367)	Epítopo sugerido
CAN03	+			+	D3
CAN05	+	+	+		D1
CAN07	+				D3
CAN08	+				D3
CAN04	+	+			D2
CAN01	+			+	D3
CAN02	+				nd*
KMT-1	+	+	+	+	policlonal

nd* = no determinado ya que los datos de mapeo del epítopo no pudieron identificar claramente el dominio específico para estas construcciones, lo que puede atribuirse a la unión a un epítopo estructural que contiene elementos de secuencia de más de un dominio, por ejemplo, la unión D2-D3.

D. Especificidad / reactividad cruzada de los anticuerpos a modo de ejemplo de la invención

Materiales y Métodos

5 Un aspecto importante de un anticuerpo candidato que lidere bien es que reaccione de forma cruzada con la misma o casi la misma potencia que la proteína homóloga en una especie relevante en toxicología. Según los lineamientos normativos generales, la unión a uno de roedor y a uno no de roedor sería el escenario preferido, pero para los 10 anticuerpos este es raramente el caso, en cambio muchos laboratorios tienen problemas para identificar cualquier especie relevante en toxicología excepto para los primates.

15 Para el presente estudio, se esperaba la reacción cruzada a primates no humanos tales como *Macaca mulata* (rhesus) o *Macaca fascicularis* (cynomolgus) ya que la proteína IL1RAP en estas especies comparte 99 % de homología a la proteína humana IL1RAP.

15 Un número de anticuerpos líderes potenciales se seleccionaron y probaron para unirse a IL1RAP recombinante de *M. fascicularis* (aa21-367) en un ensayo de ELISA.

20 Un anticuerpo a modo de ejemplo de la invención (CAN04) se probó junto con ocho anticuerpos monoclonales anti-IL1RAP comparadores (CAN01, CAN02, CAN03, CAN07, CAN08, CAN09, Mab676 de R&D, y un anticuerpo policlonal anti-IL1RAP (KMT-1).

Resultados y Conclusiones

25 Sorprendentemente, se encontró que muchos anticuerpos anti-IL1RAP probados no reaccionaron de manera cruzada con el IL1RAP de cynomolgus, entre ellos el anticuerpo de referencia comercial mAb676 de R&D, Tabla 5.

Tabla 5
Unión a IL1RAP de macaco
(Los valores en **negrita** indican clones que se identificó que reaccionaban de manera cruzada con la IL1RAP de *M. fascicularis*)

Clon	Unión a rec. <i>M. fascicularis</i> IL1RAP (OD ₄₀₅)
CAN01	0,324
CAN02	0,014
CAN09	0,022
CAN03	0,870
CAN04	0,416
CAN07	0,111
CAN08	0,375
mAb676 (R&D)	0,037
KMT-1	0,481

E. Inhibición de la señalización de IL-1 α , IL-1 β y IL-33 por los anticuerpos a modo de ejemplo de la invención

(i) Efecto de CAN04 en la señalización de IL-1 en la línea celular HEK-Blue IL-33/IL-1 β

Materiales y Métodos

35 Ya que IL1RAP es una parte funcional del complejo receptor de IL-1, los anticuerpos que se unen a IL1RAP también pueden inhibir la señalización de IL-1. Ya que un número de tipos de células de tumor han demostrado usar la IL-1 como un factor de crecimiento, esto puede ser un importante mecanismo adicional para mediar los efectos antitumorales.

40 Para la prueba de la capacidad de los anticuerpos candidatos líderes potenciales de bloquear la señalización de IL-1,

se estableció un ensayo de gen reportero dependiente de IL-1. Las células HEK-Blue IL-33/IL-1 β (InvivoGen) respondieron a la señalización de IL-1 por la liberación de fosfatasa alcalina que puede ser cuantificada por un ensayo colorimétrico. Para probar la capacidad inhibidora de los candidatos líderes, células HEK-Blue se colocaron en placas a 50 000 células/pocillo y se incubaron con los anticuerpos de prueba 45 minutos antes del estímulo con IL-1 α , IL-1 β o IL-33 en una concentración final del ensayo de 0,3 ng/ml por cada ligando. Las concentraciones finales en el ensayo de los anticuerpos fueron 100 nM - 0,01 nM. En los pocillos de control, los anticuerpos se reemplazaron por PBS. Las células se incubaron a 37 °C o/n antes de medir la cantidad de fosfatasa alcalina liberada. Los anticuerpos también se probaron para los efectos agonísticos potenciales por incubar las células en la presencia de una alta concentración de anticuerpo (10 mg/ml) en la ausencia de estímulos adicionales. Cualquier efecto agonístico de IL-1R podría por tanto registrarse como una liberación de fosfatasa alcalina.

5 Un anticuerpo a modo de ejemplo de la invención (CAN04) se probó junto con dos anticuerpos monoclonales anti-IL1RAP comparadores (CAN01 y CAN03) y un isotipo de control negativo.

10 15 **Resultados y Conclusiones**

Como se representa en la Figura 4A, el anticuerpo a modo de ejemplo CAN04 indujo una inhibición pronunciada de señalización de IL-1 β . El anticuerpo CAN03 comparador también produjo una inhibición detectable pero apreciablemente menor que CAN04. Ninguno del CAN01 comparador ni el isotipo de control produjo cualquier 20 inhibición medible de la señalización de IL1.

Además de bloquear la IL-1 β , CAN04 es también un potente inhibidor de la señalización de IL-1 α y IL-33; véase las Figuras 4B y 4C, respectivamente.

25 Ninguno de los candidatos probados mostró algún efecto agonístico.

30 (ii) *Efecto en células primarias de LMC*

Materiales y Métodos

Aspirados de médula ósea o sangre periférica se extrajeron de tres pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) en fase crónica. Se aislaron células mononucleares por centrifugación sobre Lymphoprep, y las muestras se enriquecieron por células CD34+ usando un anticuerpo anti-CD34 y perlas magnéticas (Miltenyi biotech.) Las células CD34+ se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta su uso, cuando se descongelaron y tiñeron con anticuerpos contra 35 CD34 y CD38. Se usó yoduro de propidio como un marcador viable. Usando un clasificador celular FACS Aria, se clasificaron las células viables CD34+CD38- a una densidad de 2500 células por pocillo en placas tratadas de cultivo de tejido de 96 pocillos con 100 μ l de medio de cultivo Stemspan libre de suero sin suplementos. Después del clasificado, IL1b y el anticuerpo de prueba se agregaron a los pocillos en un total de 100 μ l de Stemspan para producir un volumen final de 200 μ l por pocillo con 0-0,4 ng/ml de IL1b y 0-10 μ g/ml de anticuerpo. Las placas se incubaron a 40 37 °C, 5 % CO₂, por 7 días después de lo cual se contó el número de células viables (7AAD-) usando perlas de conteo Countbright y un FACS Canto.

45 Un anticuerpo a modo de ejemplo de la invención (CAN04) se probó junto con anticuerpos monoclonales anti-IL1RAP comparadores (CAN01) y un anticuerpo de isotipo de control negativo.

45 **Resultados y Conclusiones**

Como se muestra en la Figura 5, el cultivo de células de LMC de fase crónica primaria CD34+CD38 en la presencia de IL1b resulta en una mayor expansión celular. El aumento inducido por IL1 en la expansión celular se redujo apreciablemente con la adición del anticuerpo a modo de ejemplo CAN04 al cultivo ($p<0,0001$). También en 50 comparación con otros anticuerpos dirigidos a IL1RAP, CAN01, el CAN04 es apreciablemente más efectivo en reducir la expansión celular total ($p = 0,0022$). Concluimos que la unión de CAN04 a IL1RAP interfiere con el estímulo en la expansión celular inducida por IL1 en células de LMC primitivas primarias.

55 **F. Efecto en ADCC de los anticuerpos a modo de ejemplo de la invención**

(i) *Líneas celulares de leucemia mieloide crónica (LMC)*

Materiales y Métodos

60 Las líneas celulares de leucemia mieloide crónica (LMC) KU812, LAMA84 y BV173, o células primarias de tres pacientes con LMC en crisis blástica se usaron como células diana en el ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo in vitro (ADCC). Brevemente, las células diana se marcaron con PKH26 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 65 según las instrucciones del fabricante, y se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de 5.000-10.000 células por pocillo. Subsiguientemente, el anticuerpo a modo de ejemplo de la invención, CAN04, o anticuerpo de isotipo de control se agregó a los pocillos en diferentes concentraciones y se incubó por 30 min antes de agregar

100,000 NK de células efectoras a cada pocillo. Se extrajeron células de voluntarios sanos después de consentimiento informado usando un kit de aislamiento celular negativo de células NK según las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Alemania). Se usó un anticuerpo IgG1 humano no específico como un isotipo de control negativo en los experimentos (Eureka Therapeutics, Emeryville, CA). El grado de muerte celular se evaluó por detección de células positivas 7-AAD usando un citómetro de flujo FACS CANTO (BD). Cada experimento se realizó al menos dos veces con células NK de diferentes donadores.

Resultados y Conclusiones

10 El ensayo de ADCC *in vitro* muestra que el anticuerpo a modo de ejemplo de la invención, CAN04, dirige las células NK a eliminar las líneas celulares de LMC KU812, LAMA84 y BV173 a un mayor grado que el isotipo de control (Figura 6A). Una titulación de la dosis de CAN04 usando células diana BV173 muestra que el efecto en la eliminación celular es dependiente de la dosis con un mayor grado de eliminación celular con el aumento en la concentración de CAN04 (Figura 6B). La leucemia mieloide crónica que has progresado a crisis de blastos muestra solo un efecto transitorio al 15 tratamiento con inhibidores de tirosina cinasa y por tanto impone un problema mayor de tratamiento. El ensayo de ADCC con células primarias de dos pacientes con crisis blástica con LMC individual muestran que estas células fueron sensibles a la citotoxicidad inducida por CAN04 y células NK (Figura 6C). Además, las células de un tercer paciente con crisis blástica de LMC albergando la mutación T315I que causa resistencia a muchos inhibidores de tirosina cinasa 20 presentan una sensibilidad similar (Figura 6D). En conjunto, los experimentos muestran que el CAN04 tiene la capacidad de dirigir las células NK a una eliminación celular específica las líneas celulares de LMC así como células de LMC con crisis blástica primaria, y que el efecto citotóxico inducido por CAN04 es dependiente de la dosis.

(ii) Líneas celulares de melanoma

25 Materiales y Métodos

La línea celular de melanoma maligno SKMEL-5 se usó como una diana para el ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo *in vitro* (ADCC). Brevemente, las células diana se marcaron con PKH26 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) según las instrucciones del fabricante, y se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de 30 5,000-10,000 células por pocillo. Subsiguientemente, se agregó CAN04, o el anticuerpo de isotipo de control a los pocillos en diferentes concentraciones y se incubó por 30 min antes de agregar 100.000 NK de células efectoras a cada pocillo. Se extrajeron células de voluntarios sanos después de consentimiento informado usando un kit de aislamiento celular negativo de células NK según las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Alemania). Se usó un anticuerpo IgG1 humano no específico como un control en los experimentos (Eureka Therapeutics, Emeryville, CA). El grado de muerte celular se evaluó por detección de células positivas 7-AAD usando 35 un citómetro de flujo FACS CANTO (BD). Cada experimento se realizó al menos dos veces con células NK de diferentes donadores.

Resultados y Conclusiones

40 El ensayo de ADCC *in vitro* mostró que el CAN04 se dirige a las células NK para eliminar la línea celular SKMEL-5 a un grado mucho mayor que un isotipo de control coincidente (Figura 7). La titulación de la dosis de CAN04 mostró que el CAN04 es eficiente para inducir ADCC, a bajas concentraciones (Figura 7). En resumen, estos datos demuestran que el CAN04 tiene la capacidad de dirigir las células NK a una eliminación celular específica de SKMEL-5 en una 45 manera dependiente de la dosis y que CAN04.

G. Internalización de los anticuerpos a modo de ejemplo de la invención

Materiales y Métodos

50 Células y condiciones de cultivo: Células LAMA-84, una línea celular establecida de un paciente con leucemia mieloide crónica en crisis blástica, se obtuvieron de DSMZ (Braunschweig, Alemania) y se cultivaron según la recomendación por el proveedor. Brevemente, las células se cultivaron en RPMI 1640 con 10 % de FBS, 1 % de Glutamina y 1 % de Penicilina/ Estreptomicina en 5 % de CO₂, 37 °C. Los cultivos celulares se dividieron a una densidad de 0,5 x 10⁶ células/ml cada 2-3 días. Las células se usaron por hasta 12 pases después de ser recibidas de DSMZ.

55 Las células de la suspensión de línea celular LAMA-84 se lavaron una vez en salina regulada con fosfato (PBS) se suplementaron con 1 % de Albúmina de Suero bovino (BSA) y se volvieron a suspender en PBS-BSA se suplementaron con 5 % de suero humano AB+ de Sigma y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente (TA). 60 El anticuerpo CAN04 selectivo de IL-1RAP marcado con AlexaFluor488 (AF488), o el anticuerpo de control de isotipo coincidente, se agregó a una concentración final de 10 µg/ml. Las células se colocaron (incubadas) en hielo o a 37 °C por 2 o 16 horas.

65 Para el análisis de imagen con microscopía confocal (Microscopio confocal LSM 510 Meta Zeiss), las células se lavaron dos veces en PBS-1 % de BSA, se centrifugaron brevemente seguido por resuspensión en 3 % de fijación de paraformaldehído (en PBS) por 20 minutos (a 4 °C). Después, las células se centrifugaron, se volvieron a suspender

en PBS con 0,001 % de Triton X-100 (PBS-TX) y un marcador nuclear (DAPI), y se dejaron incubar por 5 minutos a TA. Después de una breve centrifugación las células se volvieron a suspender en PBS-TX y se colocaron en pocios de microscopio con fondo de vidrio. Después, las células se dejaron adherir por una hora. Se recolectaron datos de imagen a través de escaneo confocal de las células proporcionando imágenes de alta resolución de fluorescencia de AlexaFluor488 en secciones ópticas delgadas a través del centro de las células (representado por un marcado nuclear). Análisis posterior del anticuerpo de unión a la membrana celular y/o anticuerpos internalizados se realizaron a través de análisis de imagen por software (Zeiss Zen2010).

Resultados y Conclusiones

La relación estructural de la unión de CAN04 a la membrana celular y su capacidad de entrar a las células ("internalizar") se demuestra con los datos de formación de imagen de alta resolución registrados por medio de microscopía de escaneo de láser confocal, y por análisis de imagen de estos datos.

Las representaciones de los datos de imagen se muestran en la Figura 8.

H. Eficacia terapéutica in vivo de un anticuerpo a modo de ejemplo de la invención

Materiales y Métodos

Ratones sin acondicionar NOD/SCID se injertaron con dosis letales de células MA9Ras, generadas previamente por la transformación de células CD34⁺ sanguíneas de cordón umbilical humano por integración retrovírica de ADNc que dirigen la expresión de una fusión de MLL/AF9 y un gen NRAS activado. Los ratones leucémicos se trataron con el anticuerpo a modo de ejemplo CAN04 dirigido a IL1RAP, o un correspondiente anticuerpo de isotipo de control. Los anticuerpos se administraron por inyecciones intraperitoneales dos veces por semana a través del experimento con el primer tratamiento dado el día tres después del trasplante. Cada dosis de anticuerpo fue 500 µg, excepto por la primera que fue dada como un bolo de 1000 µg. Los ratones se sacrificaron con los signos de enfermedad severa según el juicio de estar jorobados, con pelambre sucio, y poca movilidad, o debido a tumores sólidos.

Resultados y Conclusiones

Ratones inmunodeficientes se injertaron con células leucémicas humanas y se trataron con CAN04, un anticuerpo monoclonal dirigido a IL1RAP. La frecuencia de las células leucémicas en la sangre periférica se redujo apreciablemente en el día 36 después del trasplante, y el conteo de plaquetas permaneció normal en los ratones que recibieron CAN04 en comparación con el anticuerpo de isotipo de control indicando una hematopoyesis más funcional (Figuras 9A a 9B). El tratamiento de CAN04 resultó en una reducción significativa de células leucémicas en la médula ósea y bazo (Figuras 9C a 9D). Concluimos que la inmunoterapia de anti-IL1RAP reduce la leucemia humana en la sangre periférica, médula ósea, y bazo, en el modelo de xenoinjerto MA9Ras. Los resultados soportan la inmunoterapia de anti-IL1RAP como una nueva estrategia terapéutica prometedora para LMA.

I. Efecto de (a) anticuerpos de baja fucosa y (b) mutaciones Fc en la actividad de ADCC

Materiales y Métodos

La variante humanizada de dominio variable de cadena pesada de CAN04 (que comprende SEQ ID No: 9) se subclonó en el vector con el dominio constante humano IgG1za (SEQ ID NO:19).

La variante humanizada de dominio variable de cadena ligera de CAN04 (que comprende SEQ ID No: 16) se subclonó en el vector con el dominio constante humano Kappa (SEQ ID NO:18).

Para examinar el efecto de baja fucosa, el anticuerpo hCAN04 "Fc-1" (véase lo siguiente) se expresó transitoriamente por cotransfección de los vectores resultantes en células HEK293 cultivadas en medio con Kinfunensina. El anticuerpo Fc-1, producido por expresión en la ausencia de Kinfunensina, se usó como el control de "fucosa normal"

Para resolver como varios mutantes con FC diseñado de hCAN04 afectan la actividad de ADCC, las variantes de hCAN04 diseñadas genéticamente se generaron como sigue:

Fc-1 = (CAN04 humanizado con Fc de tipo silvestre; es decir, hCAN04 variante 6 en la Tabla 3)

Fc-2 = (como Fc-1 pero con mutaciones S239D/S298A/I332E)

Fc-3 = (como Fc-1 pero con mutaciones S239D/A330L/I332E)

Fc-4 = (como Fc-1 pero con mutaciones S239D/I332E)

Fc-5 = (como Fc-1 pero con mutaciones S298A/E333A/K334A)

Fc-6 = (como Fc-1 pero con mutación N297Q)

Fc-7 = (como Fc-1 pero con mutación N297S)

Fc-8 = (como Fc-1 pero con mutaciones P247I/A339Q).

En donde la posición de las mutaciones del aminoácido se define usando el Esquema de Numeración de Eu, que difiere de la numeración en SEQ ID NO: 18 y 19 anteriores; véase Edelman *et al.*, 1969, *Proc Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 63:78-85).

5 Los anticuerpos se purificaron usando cromatografía de afinidad de la Proteína A.

Los ensayos de ADCC se realizaron usando la línea celular SKMEL5.

Resultados y Conclusiones

10 Una variante baja en fucosa de hCAN04, producida en la presencia de kinfunensina, fue superior a una variante de CAN04 de fucosa normal CAN04 (Figura 10).

15 El efecto de la mutación de Fc en la actividad de ADCC fue dependiente de la mutación(es) realizadas. Así:

- 15 (a) La actividad de ADCC de las variantes Fc-6 y Fc-7 del CAN04 humanizado se abrogó por completo;
 (b) La actividad de ADCC de las variantes Fc-3, Fc-4, y Fc-5 del CAN04 humanizado se mejoró, incluso con respecto a la variante baja en fucosa de CAN04;
 20 (c) La actividad de ADCC de la variante de Fc-8 del CAN04 humanizado fue similar a esa de la forma baja en fucosa del CAN04
 (d) La actividad de ADCC de la variante Fc-2 del CAN04 humanizado fue similar a esa de la forma de fucosa normal del CAN04.

J. Análisis de unión competitiva por ELISA

25 Protocolo

- Todas las muestras deben ser analizadas por duplicado.
- Revestir una placa Nunc-MaxiSorp 96 Micro Well™ con 100 μ l/pocillo de hIL1RAP 21-367 recombinante (1 μ g/ml) diluido en 0,01 M de PBS, pH 7,4.
- Incubar la placa durante la noche a 4 °C.
- Lavar la placa con regulador de lavado de ELISA (PBS 0,01 M, 0,05 % de Tween 20, pH 7,4).
- Agregar 150 μ l/pocillo de solución de bloqueo de ELISA (PBS, 0,5 % de BSA, 0,05 % de Tween 20, pH 7,4).
- Incubar la placa por 1 h a temperatura ambiente (TA) bajo agitación.
- 35 • Lavar la placa con regulador de lavado de ELISA.
- Agregar las muestras de los artículos de prueba (por ejemplo, mAb 1, mAb 2) a los pocillos (100 μ l/pocillo, 10 μ g/ml).
- Incubar la placa por 1 h a TA.
- Lavar la placa con solución de lavado de ELISA.
- 40 • Agregar una solución de anticuerpo de referencia CAN04 (100 μ l/pocillo, 1 μ g/ml) a todos los pocillos.
- Incubar la placa por 1 h a TA.
- Lavar la placa con regulador de lavado de ELISA.
- Agregar 100 μ l/pocillo de un anticuerpo secundario adecuado conjugado a IgG alcalino de conejo anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina (si los artículos de prueba son anticuerpos humanos, un anticuerpo secundario adecuado sería anticuerpo IgG Cabra Anti-ratón (específico de Fc)-fosfatasa alcalina, SIGMA, A1418).
- 45 • Incubar la placa por 1 h a TA bajo agitación.
- Lavar la placa con regulador de lavado.
- Agregar 100 μ l de sustrato de pNPP por pocillo. (sal disódica hexahidratada de 4-Nitrofenil fosfátido, SIGMA, 1 mg/ml).
- 50 • Incubar la placa a TA bajo agitación y medir la absorbancia a 405 nm consecutivamente durante 30 min. La absorbancia a 0 min debe tomarse como una señal de fondo.

REIVINDICACIONES

5 1. Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo con especificidad de unión por la proteína
accesoria del receptor de Interleucina-1 humana (IL1RAP), en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno
son capaces de inhibir la unión del anticuerpo de referencia "CAN04" a la IL1RAP humana, en donde el anticuerpo de
referencia "CAN04" es un anticuerpo de IgG intacto que comprende regiones variables de cadenas pesada y ligera
que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y 2 respectivamente, y

10 en donde el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena
pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 8 a 11 o una
secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con las mismas:

i. Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A
S G Y A F S S S W M N W V R Q A P G Q G L E W
M G R I Y P G D G N T H Y A Q K F Q G R V T L
T A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y
Y C G E G Y L D P M D Y W G Q G T L V T V S S
[SEQ ID NO: 8];

ii. Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A
S G Y A F T S S W M N W V R Q A P G Q G L E W
M G R I Y P G D G N T H Y A Q K F Q G R V T L
T A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y
Y C G E G Y L D P M D Y W G Q G T L V T V S S
[SEQ ID NO: 9];

iii. Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A
S G Y T F T S S W M N W V R Q A P G K G L E W
M G R I Y P G D G Q T H Y A Q K F Q G R V T L
T A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y
Y C G E G Y L D P M D Y W G Q G T L V T V S S
[SEQ ID NO: 10]; o

iv. Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A
S G Y T F T S S W M N W V R Q A P G K G L E W
M G R I Y P G D G Q T H Y A Q K F Q G R V T I
T A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y
Y C G E G Y L D P M D Y W G Q G T L V T V S S
[SEQ ID NO: 11],

20 y una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de una
cualquiera de las SEQ ID NO: 15 a 17 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad
de secuencia con las mismas:

v. D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A
S Q G I N N Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I
H Y T S G L H A G V P S R F S G S G S G T D Y
T L T I S S L Q P E D V A T Y Y C Q Q Y S I L P
W T F G G G T K V E I K R
[SEQ ID NO: 15];

vi. D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C Q
 A S Q G I N N Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L
 I H Y T S G L H A G V P S R F S G S G S G T D
 Y T L T I S S L E P E D V A T Y Y C Q Q Y S I L
 P W T F G G G T K V E I K R
 [SEQ ID NO: 16]; o

vii. D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C
 Q A S Q G I N N Y L N W Y Q Q K P G K A P K L
 L I H Y T S G L H A G V P S R F S G S G S G T
 D F T L T I S S L E P E D V A T Y Y C Q Q Y S I
 L P W T F G G G T K V E I K R
 [SEQ ID NO: 17];

5 y en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno presentan una o más de las siguientes propiedades:

a) una afinidad de unión (K_D) por la IL1RAP humana de 200 pM o mayor;
 y/o

10 b) capacidad de internalización al unirse con una o más líneas celulares de cáncer (tal como una línea celular de LMC, LMA y/o melanoma).

15 2. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno presentan reactividad cruzada con IL1RAP de *Macaca fascicularis* y/o son capaces de inducir ADCC en una o más líneas celulares de cáncer (tal como una línea celular de LMC, LMA y/o melanoma).

20 3. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo según las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno son capaces de inducir ADCC de células que expresan IL1RAP.

25 4. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprenden o consisten en un anticuerpo intacto.

5. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprenden o consisten en un fragmento de unión a antígeno seleccionado del grupo que consiste en fragmentos Fv, fragmentos tipo Fab y anticuerpos de dominio.

25 6. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende las siguientes CDR:

30 a) GYAFSSS [SEQ ID NO: 3] o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 60 % de identidad de secuencia con la misma, por ejemplo, al menos un 70 %, 80 % o 90 % de identidad de secuencia;
 b) YPGDGN [SEQ ID NO: 4] o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 60 % de identidad de secuencia con la misma, por ejemplo, al menos un 70 %, 80 % o 90 % de identidad de secuencia; y
 35 c) GYLDPMY [SEQ ID NO: 5] o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 60 % de identidad de secuencia con la misma, por ejemplo, al menos un 70 %, 80 % o 90 % de identidad de secuencia.

40 7. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende las siguientes CDR:

a) SASQGINNYLN [SEQ ID NO: 12] o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 60 % de identidad de secuencia con la misma, por ejemplo, al menos un 70 %, 80 % o 90 % de identidad de secuencia;
 b) YTSGLHA [SEQ ID NO: 13] o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 60 % de identidad de secuencia con la misma, por ejemplo, al menos un 70 %, 80 % o 90 % de identidad de secuencia; y
 45 c) QQYSILPWT [SEQ ID NO: 14] o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 60 % de identidad de secuencia con la misma, por ejemplo, al menos un 70 %, 80 % o 90 % de identidad de secuencia.

8. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprenden una región Fc.

50 9. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo son capaces de inhibir la señalización de IL1 y/o capaces de inhibir la señalización de IL33 y/o capaces de inhibir la señalización de IL36.

10. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones

anteriores que comprenden, además, una porción citotóxica y/o una porción detectable.

11. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores o una cadena polipeptídica componente de la misma.

5 12. Una célula hospedadora recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 11.

10 13. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo o de un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un diluyente, un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

15 14. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en el tratamiento de un trastorno neoplásico en un sujeto, en donde el trastorno neoplásico se asocia a células que expresan IL1RAP.

20 15. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o una afección susceptibles de tratamiento con un inhibidor de señalización de IL-1, en donde la enfermedad o la afección susceptibles de tratamiento con un inhibidor de señalización de IL-1 se seleccionan del grupo que consiste en artritis reumatoide, todos los tipos de artritis juvenil incluyendo artritis idiopática juvenil de inicio sistémico (SOJIA), artrosis, síndrome autoinflamatorio familiar inducido por frío (FCAS), enfermedad de Muckle-Wells, enfermedad inflamatoria multisistémica de inicio neonatal (NOMID), fiebre Mediterránea familiar (FMF), síndrome de artritis piógena, pioderma gangrenoso y acné (PAPA), enfermedad de Still de inicio en el adulto, síndrome de hiper IgD, diabetes mellitus tipo 2, síndrome de activación de macrófagos, síndrome periódico asociado al receptor de TNF, enfermedad de Blau, espondilitis anquilosante, enfermedad de Sweets, artritis lúpica, enfermedad de Alzheimer, psoriasis, asma, ateroesclerosis, sarcoidosis, dermatitis atópica, lupus eritematoso sistémico, pénfigo ampolloso, diabetes mellitus tipo I, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, gastritis por *Helicobacter pylori*, enfermedad inflamatoria intestinal, hepatitis C, lesión por isquemia-reperfusión, esclerosis múltiple, meningitis neisérica o neumocócica, tuberculosis, síndrome de Bechet, choque séptico, enfermedad de injerto contra huésped, asma, diabetes tipo I, enfermedad de Alzheimer, ateroesclerosis, leucemia de linfocitos T del adulto, mieloma múltiple, periodontitis, obesidad, síndrome metabólico, cardiomegalia, insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, venas varicosas, síndrome del ovario poliquístico, enfermedad de reflujo gastroesofágico (GERD), enfermedad del hígado graso, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer uterino, insuficiencia renal crónica, accidente cerebrovascular, hiperuricemia, enfermedad del disco intervertebral, síndrome del intestino irritable, síndrome de Schnitzler, alergia/dermatitis atópica y gota.

35

FIGURA 1

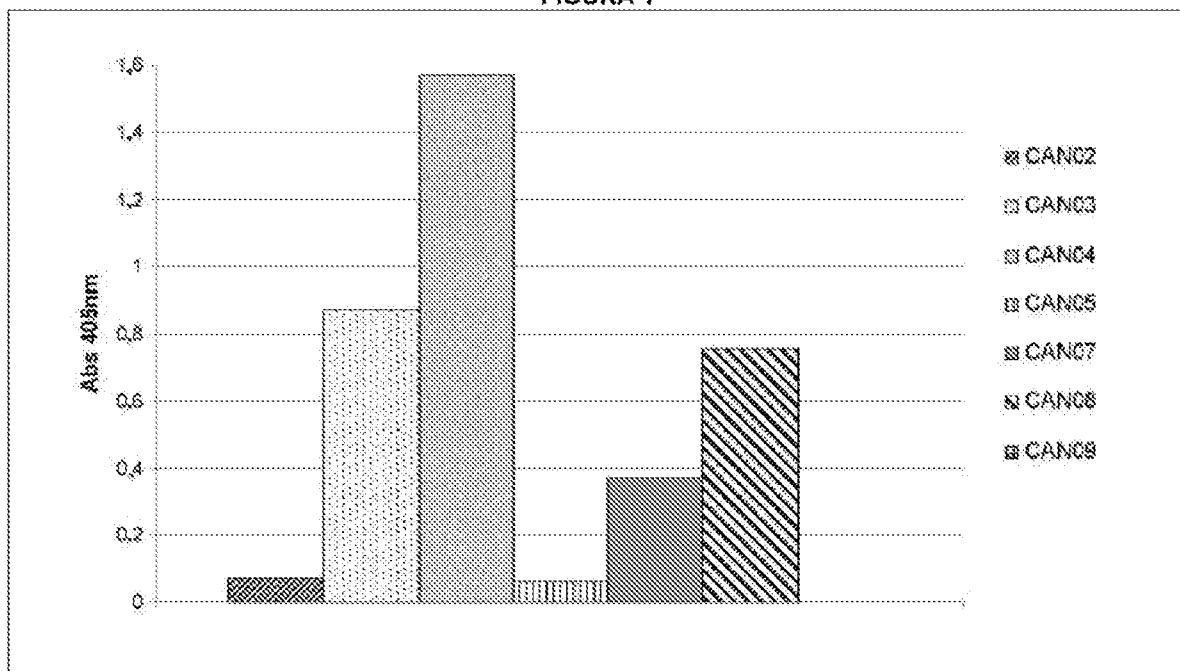
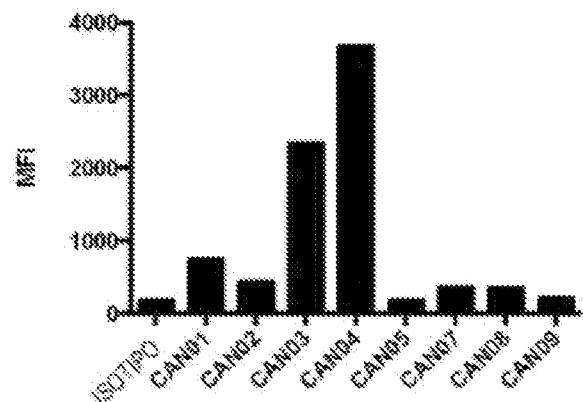
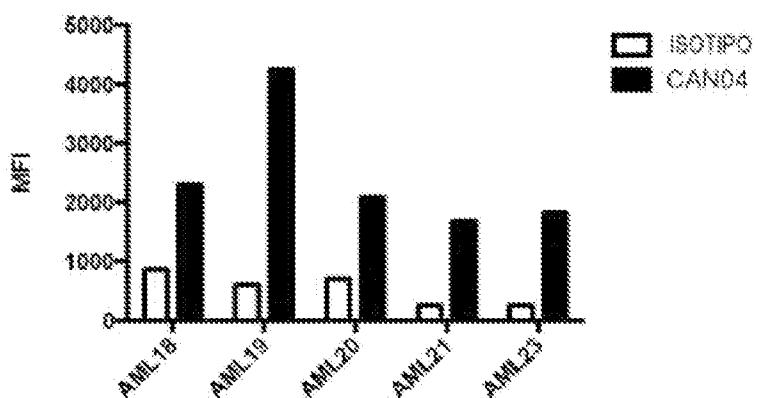


Figura 2

A.



B.



C.

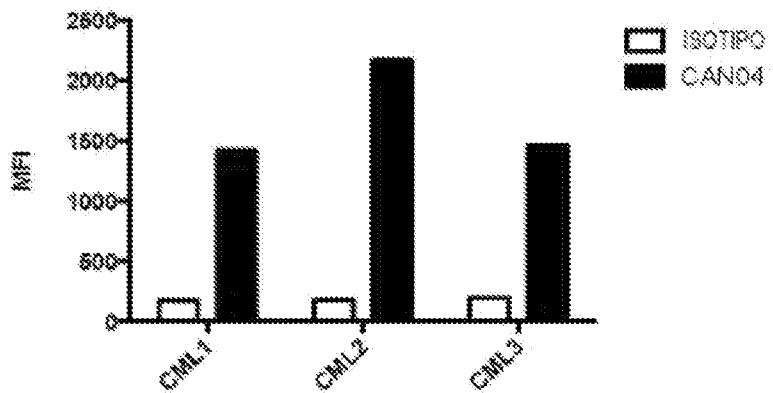


FIGURA 3

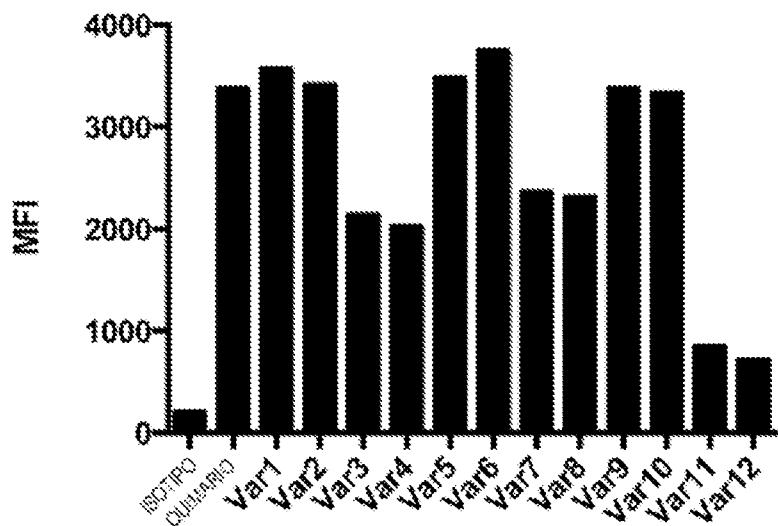


FIGURA 4(A)

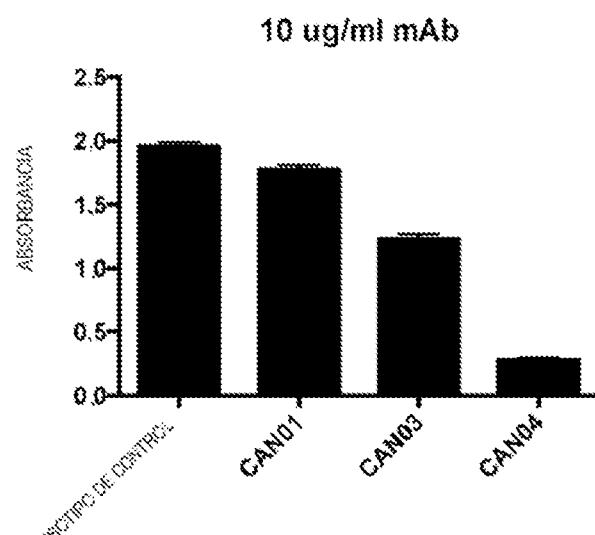


FIGURA 4(B)

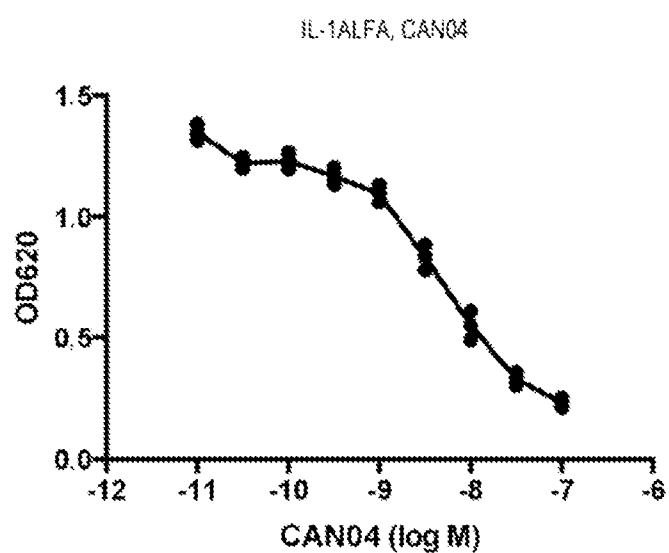


FIGURA 4(C)

ESTIMULO DE IL-33

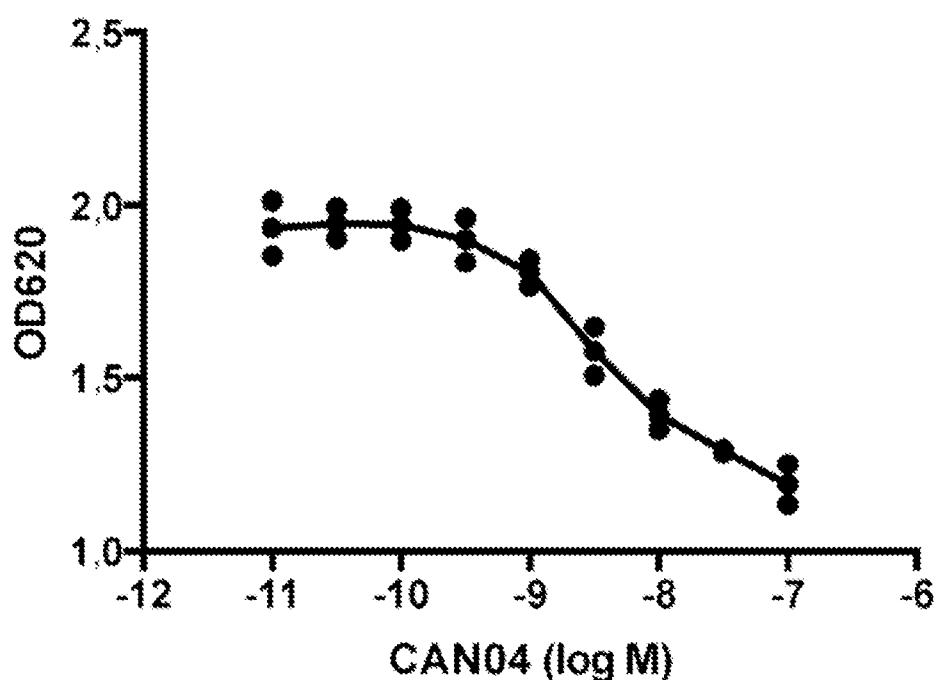


FIGURA 5

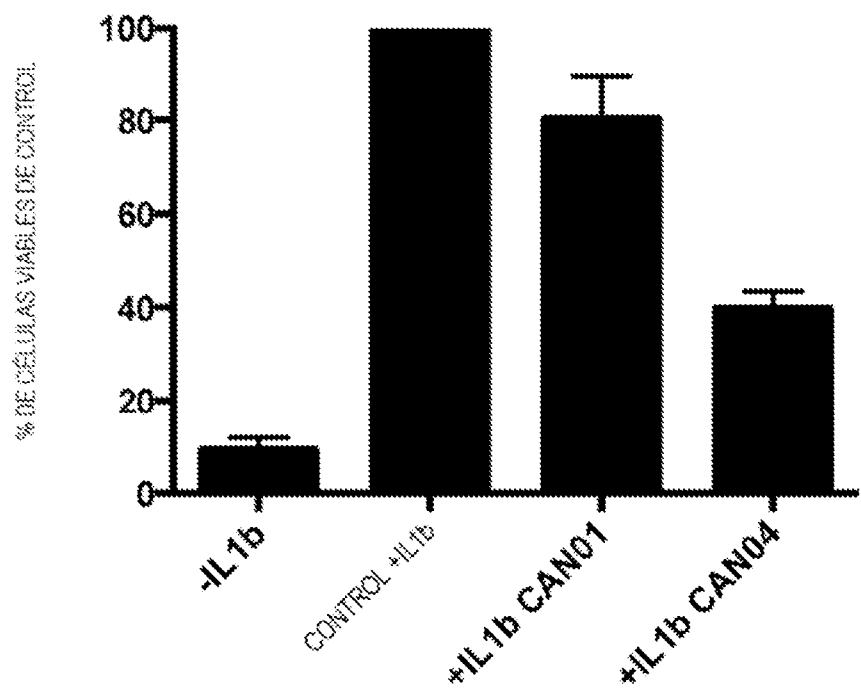
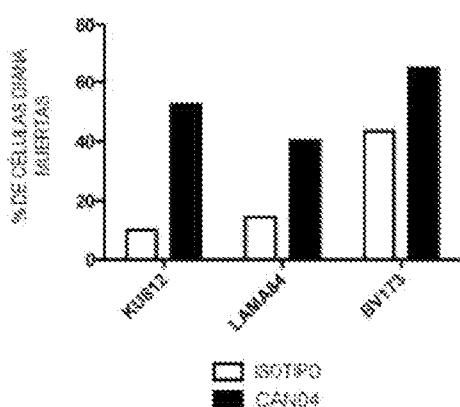
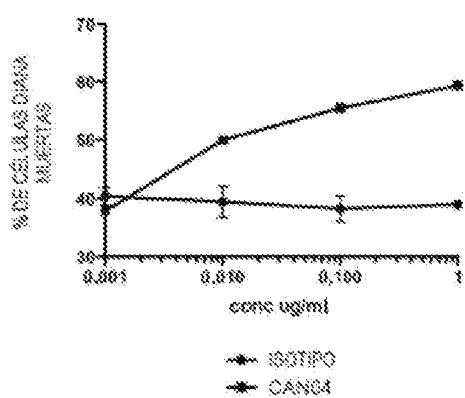


FIGURA 6

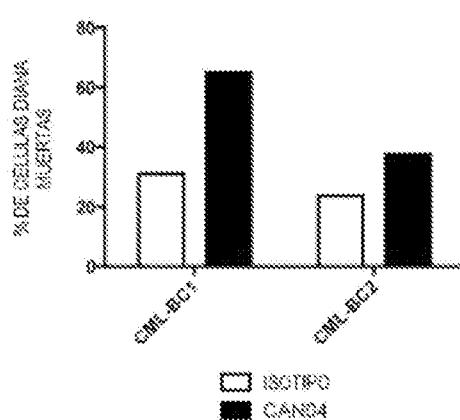
A.



B.



C.



D.

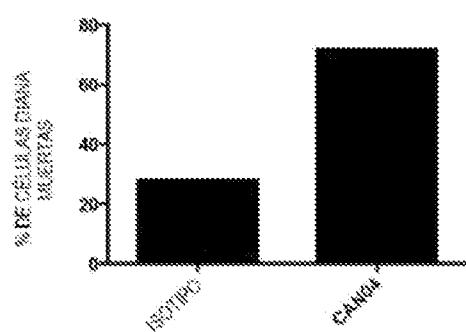


FIGURA 7

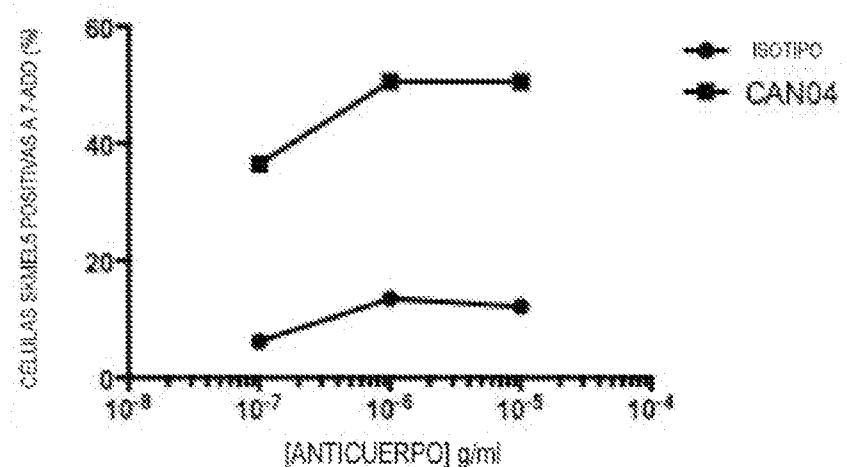
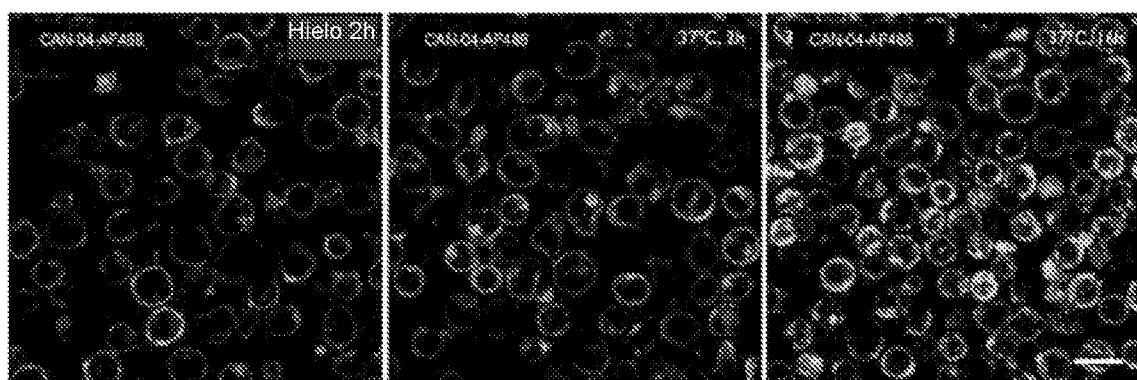


FIGURA 8

A.



B.

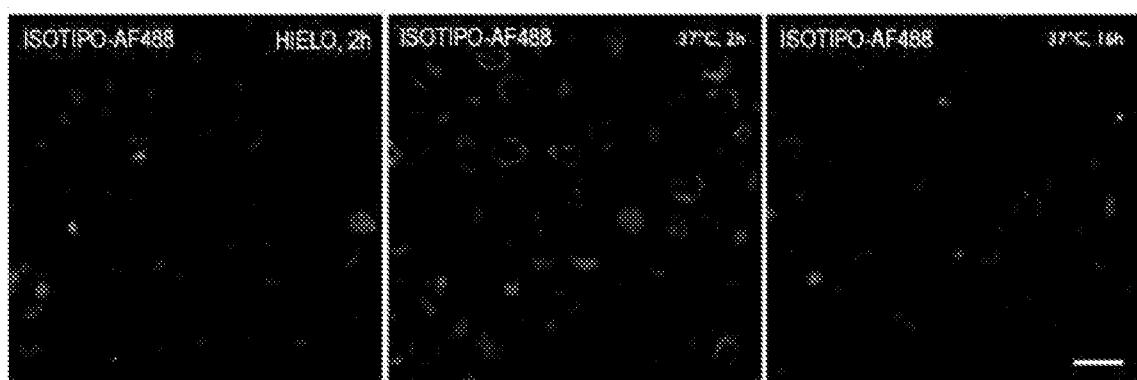


FIGURA 9

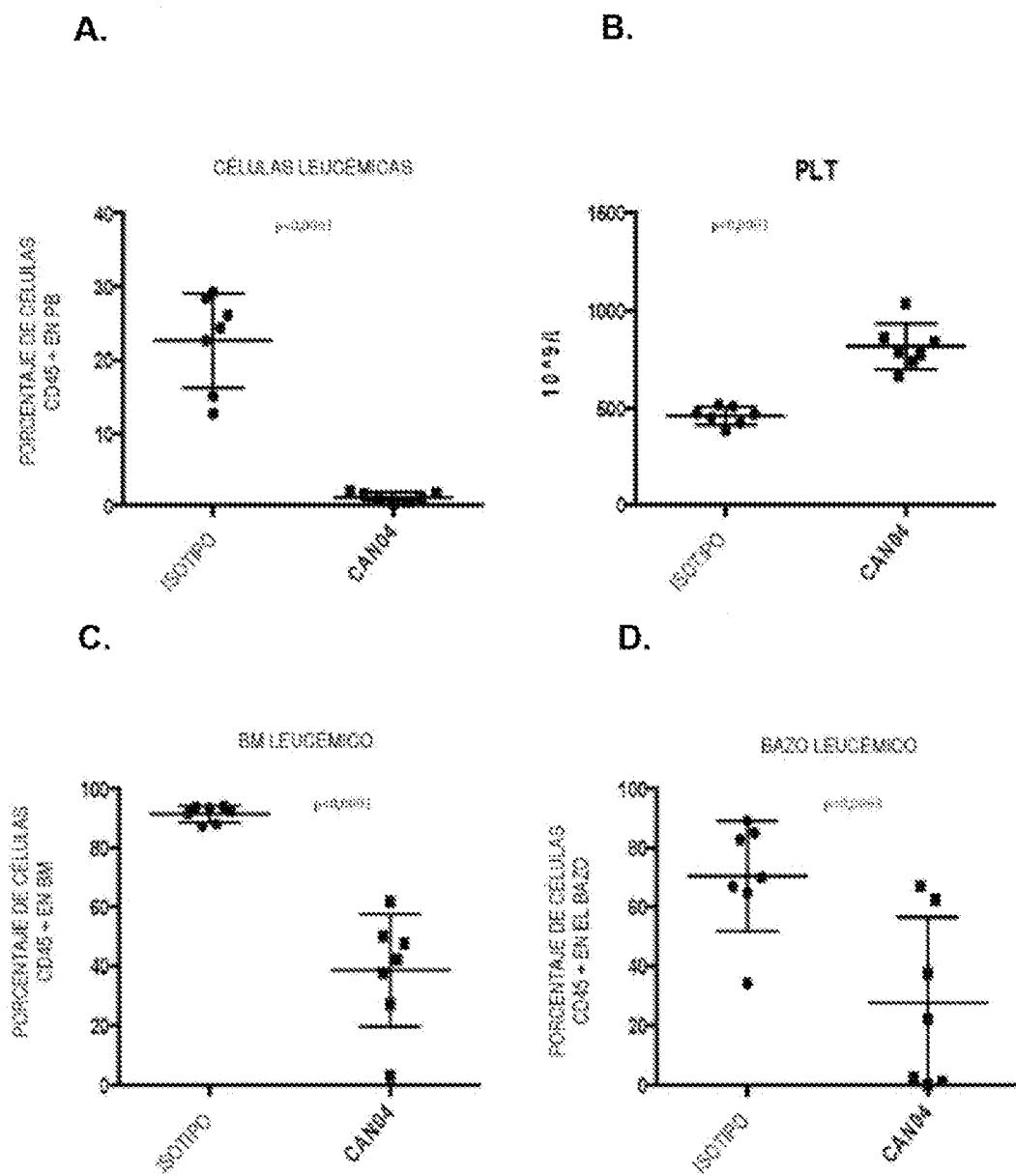


FIGURA 10 (A)

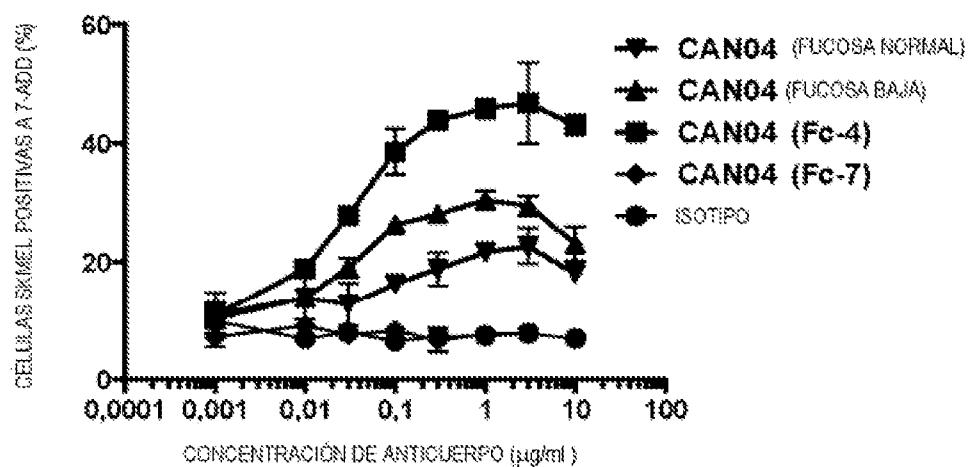


FIGURA 10 (B)

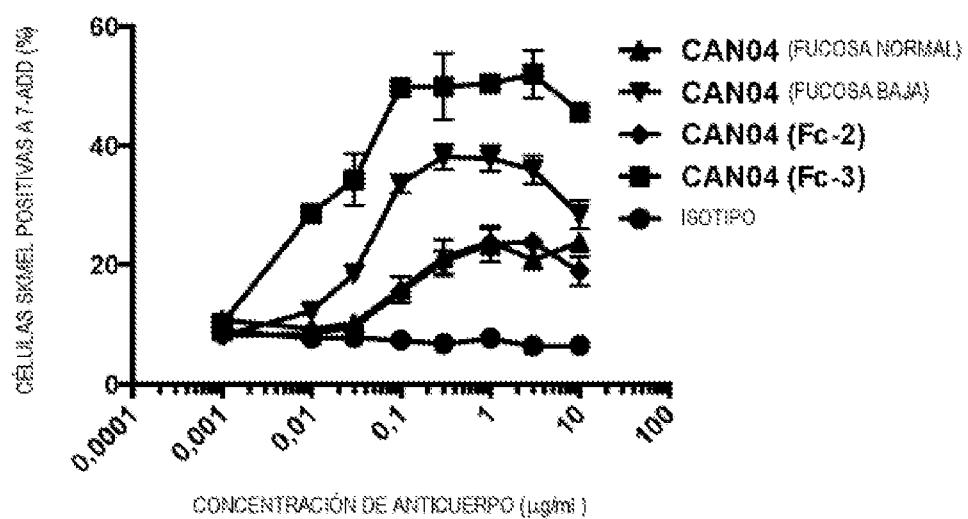


FIGURA 10 (C)

