

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 804 704**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2013 PCT/IB2013/058317**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014 WO14037899**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2013 E 13792452 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 2892923**

54 Título: **Moléculas de unión a IL-18**

30 Prioridad:

07.09.2012 US 201261697981 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.02.2021

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35-
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BARDROFF, MICHAEL OTTO;
BRANNETTI, BARBARA;
CAMPBELL, EMMA MICHELLE;
DIEFENBACH-STREIBER, BEATE;
EBERTH, ADINA;
KUNZ, CHRISTIAN CARSTEN SILVESTER;
MARSHALL, SYLWIA;
RONDEAU, JEAN-MICHEL RENE;
SCHLAEPP, JEAN-MARC ALFRED y
VAN HEEKE, GINO ANSELMUS**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 804 704 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Moléculas de unión a IL-18

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a moléculas de unión, más particularmente a inmunoglobulinas tales como anticuerpos o fragmentos de los mismos, que se unen con la citoquina Interleuquina 18 (IL-18) pero no se unen a IL-18 en complejo con el inhibidor endógeno de la proteína de unión a Interleuquina 18 (IL-18BP). La presente invención también se refiere a polinucleótidos que codifican dichas moléculas de unión, a composiciones farmacéuticas que comprenden dichas moléculas de unión, a métodos para tratar y/o prevenir enfermedades utilizando dichas moléculas de unión. Otros aspectos, objetos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la descripción que figura a continuación.

15 Antecedentes de la invención

La interleuquina-18 (IL-18) se describió originalmente en 1989 como factor inductor de interferón gamma (IGIF). IL-18 está relacionada con la familia IL-1 y está estructuralmente relacionada con IL-1 β (Okamura H et al. (1995) Nature; 378:88-91). IL-18 es producida principalmente por macrófagos y células T como una proteína precursora (pro-IL-18) y es secretada como una proteína activa después de la escisión por parte de caspasa-1 (Dinarello CA et al (1999) J Allergy Clin Immunol; 103:11-24). En fisiología normal, IL-18, en sinergia con IL-12, se asocia con la inducción de inmunidad mediada por células después de la infección con productos microbianos tales como el lipopolisacárido (LPS) (Sareneva T et al (2000) J Immunol; 165(4):1933-8). Después de la estimulación con IL-18, células asesinas naturales (NK) y células T liberan la citoquina interferón gamma (INF- γ) que juega un papel importante en la activación de macrófagos y otras células. IL-18 también tiene diversas funciones, además de la capacidad de inducir interferón gamma. Estas propiedades biológicas incluyen la activación de NF- κ B, F como la expresión del ligando, la inducción de quimioquinas tanto CC como CXC y una producción incrementada de virus de inmunodeficiencia humana competente. Debido a la capacidad de IL-18 de inducir la producción de INF- γ en células T y macrófagos, desempeña un papel importante en las respuestas inmunes de tipo Th1 y participa tanto en la inmunidad innata como adquirida.

IL-18 se une con alta afinidad y señala a través del receptor de IL-18 (IL-18R), un complejo heteromérico de cadenas alfa y beta codificadas por los genes IL18R1 e IL18RAP, respectivamente (Torigoe K et al (1997) J Biol Chem; 272(41):25737-42). La bioactividad de IL-18 está regulada negativamente por la proteína de unión a IL-18 (IL18BP), un inhibidor que se produce de forma natural y altamente específico. Esta proteína soluble forma un complejo con IL-18 libre, evitando su interacción con el receptor de IL-18, neutralizando e inhibiendo así su actividad biológica (Dinarello CA (2000) Ann Rheum Dis; 59 Supl 1: i17-20). IL-18BP es una proteína secretada constitutivamente con alta afinidad de unión a IL-18. Las variantes alternativas de corte y empalme de ARNm de IL-18BP dan como resultado cuatro isoformas. La isoforma 'a' prominente está presente en el suero de seres humanos sanos con un exceso molar de 20 veces en comparación con IL-18 (Dinarello y Kaplanski (2005) Expert Rev Clin Immunol, 1(4), 619-632).

Además de su función fisiológica, se ha demostrado que IL-18 media en una diversidad de enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Se ha demostrado que la expresión de IL-18 está regulada al alza en varias enfermedades autoinmunes, tales como la enfermedad de Crohn, la psoriasis, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple y enfermedades cardiovasculares (Braddock et al. (2004) Expert Opin Biol Ther; 4(6):847-860). IL-18 también está regulada al alza en determinadas enfermedades inflamatorias, tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) (Imaoka et al. (2008) Eur Respir; J31: 287-297), fibrosis pulmonar idiopática (IPF) (Kitasato et al. (2004) Am J Resp Cell Mol Biol; 31:619-625), síndrome de activación de macrófagos (MAS) (Dinarello y Kaplanski (2005) Expert Rev Clin Immunol; 1(4): 619-632), enfermedad de Still de inicio en adultos (AOSD) (Arlet JB et al. (2006) Ann Rheum Dis 65(12):1596-601) y artritis idiopática juvenil sistémica (SJIA) (Akashi et al. (1994) Br J Haematol; 87(2):243- 50).

Estudios recientes han demostrado altas cantidades de IL-18 e INF- γ en formas tanto heredadas como adquiridas de linfocitosis hemofagocítica (HLH). La HLH se caracteriza por linfocitos e histiocitos activados que secretan grandes cantidades de citoquinas inflamatorias (Janka GE et al (2007) Eur J Paediatr; 166:95-109) y por la función deficiente de células NK y células T citotóxicas. Lo más importante, se ha demostrado que ambas formas se caracterizan por la desregulación de IL-18 (Mazodier et al (2005) Immunobiology 106(10):3483-89).

El desarrollo de moléculas terapéuticas para dianas tales como IL-18 que están regulados por inhibidores naturales puede ser muy desafiante. La presencia de una cantidad incrementada de IL-18 total sistémica o local no siempre refleja el nivel de proteína biológicamente activa (IL-18 libre de IL-18BP).

Se requeriría un compuesto terapéutico que uniera tanto IL-18 libre como IL-18 en complejo a IL-18BP, aunque potencialmente fuese capaz de neutralizar la actividad de IL-18, en dosis más altas que una que pueda unir selectivamente solo IL-18 libre biológicamente activa. Compuestos terapéuticos que necesitan ser administrados en dosis altas pueden conducir a efectos secundarios más pronunciados o volverse inmunogénicos. Dosis altas también se traducen en altos costos de producción.

El documento WO 2012/085015 describe una molécula de anticuerpo aislada para IL-18 humana que se une específicamente a un epítipo de IL-18 humana que se solapa total o parcialmente con el sitio de unión a IL-18BP en IL-18 humana y que compete por unirse a IL-18 con IL-18BP.

5 Compuestos terapéuticos que compiten por IL-18 cuando se unen a IL-18BP pueden perturbar los equilibrios delicados de IL-18 libre/activa e IL-18 unida a IL-18BP/inactiva existente en pacientes afectados por enfermedades/trastornos caracterizados por la desregulación de IL-18.

10 Finalmente, sería muy difícil investigar enfermedades caracterizadas por la desregulación de IL-18 libre, en ausencia de una herramienta de diagnóstico capaz de detectar y/o medir IL-18 libre de IL-18BP como componente de la IL-18 total.

Sumario de la Invención

15 La invención se recoge en el juego de reivindicaciones adjunto. Las realizaciones y/o los ejemplos de la siguiente descripción que no están cubiertos por las reivindicaciones adjuntas no se consideran parte de la presente invención.

20 Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona una molécula de unión que es un anticuerpo completamente humano aislado o quimérico o un fragmento del mismo que se une específicamente a IL-18, pero que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18, en donde el anticuerpo aislado o un fragmento comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 14 y un dominio variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 16.

25 En esta memoria se describe la molécula de unión que se une a un epítipo de IL-18 en IL-18 tal como se define con referencia a SEQ ID NO: 1, en donde el epítipo comprende los aminoácidos Arg140 y Glu152.

De acuerdo con la divulgación, el epítipo puede comprender, además, uno cualquiera o más de los aminoácidos Gln92, Pro93, Gly95, Pro143, Glu157 o Glu177.

30 De acuerdo con la divulgación, el epítipo puede comprender, además, uno o más de los aminoácidos Lys89, Arg94, Met96, Phe138, Ser141, Gly144, His145, Asp146, Gln150 o Leu180.

En otra realización de este aspecto, la molécula de unión no compete con IL-18BP por la unión de IL-18 cuando IL-18BP se une a IL-18.

35 En otra realización de este aspecto, la molécula de unión se une a IL-18, en donde IL-18 comprende desde el aminoácido 37 al aminoácido 193 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

40 En otra realización de este aspecto, la molécula de unión inhibe la producción de interferón gamma (INF- γ) dependiente de IL-18.

En otra realización de este aspecto, la molécula de unión se une a IL-18 con una K_D de 100 pM o menos.

45 En otra realización de este aspecto, la molécula de unión de acuerdo con la invención es un anticuerpo completamente humano, humanizado o quimérico aislado o un fragmento del mismo, preferiblemente un anticuerpo completamente humano aislado.

En otra realización de este aspecto, la molécula de unión es un fragmento de anticuerpo, preferiblemente un Fab, un Fab', un F(ab')₂ o un scFv.

50 También se describe en esta memoria una molécula de unión, en donde la molécula de unión es un anticuerpo biespecífico aislado o fragmento del mismo que comprende una primera especificidad para IL-18 y una segunda especificidad para otro polipéptido, p. ej., IL-12 o IL-1 β .

55 También se describe en esta memoria una molécula de unión, en donde la molécula de unión es un anticuerpo aislado que comprende una región Fc de aminoácidos mutada o modificada químicamente, en donde la región Fc de aminoácidos mutada o modificada químicamente evita o disminuye la actividad ADCC y/o aumenta la semivida en comparación con una región Fc de tipo salvaje. Preferiblemente, la región Fc de aminoácidos mutada o modificada químicamente es una región Fc de IgG1 silenciosa.

60 También se describe en esta memoria una molécula de unión, en donde la molécula de unión es un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), el anticuerpo aislado o un fragmento del mismo comprende:

65 i. una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 3 o variantes conservadoras de la misma y

ii. una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13 o variantes conservadoras de la misma y

iii. una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 5 o variantes conservadoras de la misma y

iv. una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 6 o variantes conservadoras de la misma y

v. una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 7 o variantes conservadoras de la misma y

vi. una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 8 o variantes conservadoras de la misma.

Preferiblemente, tal como se describe en esta memoria, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada H-CDR 2 que comprende SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 13.

También se describe en esta memoria una molécula de unión, en donde la molécula de unión es un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), el anticuerpo aislado o un fragmento del mismo comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 20 o variantes conservadoras de la misma.

También se describe en esta memoria una molécula de unión, en donde la molécula de unión es un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), el anticuerpo aislado o un fragmento del mismo comprende:

un dominio variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 25 o SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 34 o variantes conservadoras de la misma y un dominio variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 16 o variantes conservadoras de la misma o

ii. un dominio variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 37 o la SEQ ID NO: 40 o variantes conservadoras de la misma y un dominio variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 20 o variantes conservadoras de la misma.

Preferiblemente, el dominio variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 14 o variantes conservadoras del mismo y un dominio variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO: 16 o variantes conservadoras del mismo y, opcionalmente, el aminoácido lisina (Lys; K) en la posición 30 con referencia a la SEQ ID NO: 14 está reemplazado por un aminoácido seleccionado de asparagina (Asn; N) o serina (Ser; S) o treonina (Thr; T) o alanina (Ala; A) o glutamato (Glu; E) o histidina (His; H) o leucina (Leu; L) o glutamina (Gln; Q) o arginina (Arg; R) o valina (Val; V) o tirosina (Tyr; Y) o isoleucina (Ile; I).

También se describe en esta memoria una molécula de unión, en donde la molécula de unión es un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), el anticuerpo aislado o un fragmento del mismo comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 18 o variantes conservadoras de la misma y un dominio variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 20 o variantes conservadoras de la misma.

En otra realización de la invención, el anticuerpo aislado o fragmento del mismo comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 43 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 45.

También se describe en esta memoria una molécula de unión, en donde la molécula de unión es un anticuerpo aislado que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), el anticuerpo aislado o un fragmento del mismo comprende:

una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 50 o SEQ ID NO: 56 o variantes conservadoras de la misma y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 45 o variantes conservadoras de la misma o

ii. una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 100 o SEQ ID NO: 158 o variantes conservadoras de la misma y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 160 o variantes conservadoras de la misma.

También se describe en esta memoria una molécula de unión, en donde la molécula de unión es un anticuerpo aislado que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), el anticuerpo aislado o un fragmento del mismo comprende:

i. una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 43 o variantes conservadoras de la misma y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 45 o variantes conservadoras de la misma o

5 ii. una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 158 o variantes conservadoras de la misma y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 160 o variantes conservadoras de la misma.

También se describe en esta memoria una molécula de unión, en donde la molécula de unión es un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), el anticuerpo aislado o un fragmento del mismo comprende:

10

i. una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 74 o variantes conservadoras de la misma y

15

ii. una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 75 o SEQ ID NO: 76 o SEQ ID NO: 77 o SEQ ID NO: 78 o variantes conservadoras de la misma y

iii. una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 79 o variantes conservadoras de la misma y

20

iv. una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 80 o variantes conservadoras de la misma y

25

v. una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 81 o variantes conservadoras de la misma y

vi. una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 82 o variantes conservadoras de la misma.

30

También se describe en esta memoria una molécula de unión, en donde la molécula de unión es un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), el anticuerpo aislado o un fragmento del mismo comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 85 o variantes conservadoras de la misma y un dominio variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 83 o SEQ ID NO: 87 o SEQ ID NO: 90 o SEQ ID NO: 93 o variantes conservadoras de la misma.

35

También se describe en esta memoria una molécula de unión, en donde la molécula de unión es un anticuerpo aislado que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18 / IL-18 (IL-18 BP), el anticuerpo aislado comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 96 o SEQ ID NO: 103 o variantes conservadoras de la misma y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 98 o variantes conservadoras de la misma.

40

También se describe en esta memoria una molécula de unión, en donde la molécula de unión es un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), el anticuerpo aislado o un fragmento del mismo comprende:

45

i. una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 106 o variantes conservadoras de la misma y

50

ii. una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 107 o SEQ ID NO: 122 o variantes conservadoras de la misma y

iii. una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 108 o variantes conservadoras de la misma y

55

iv. una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 109 o variantes conservadoras de la misma y

v. una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 110 o variantes conservadoras de la misma y

60

vi. una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 111 o SEQ ID NO: 126 o variantes conservadoras de la misma.

También se describe en esta memoria una molécula de unión, en donde la molécula de unión es un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), el anticuerpo aislado o un fragmento del mismo comprende:

65

- i. una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 106 o variantes conservadoras de la misma y
- 5 ii. una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 107 o variantes conservadoras de la misma y
- 10 iii. una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 108 o variantes conservadoras de la misma y
- iv. una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 109 o variantes conservadoras de la misma y
- 15 v. una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 110 o variantes conservadoras de la misma y
- vi. una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 111 o variantes conservadoras de la misma.
- 20 También se describe en esta memoria una molécula de unión, en donde la molécula de unión es un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), el anticuerpo aislado o un fragmento del mismo comprende:
- 25 i. un dominio variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 112 o variantes conservadoras de la misma y un dominio variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 114 o variantes conservadoras de la misma o
- 30 ii. un dominio variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 138 o variantes conservadoras de la misma y un dominio variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 140 o variantes conservadoras de la misma.
- También se describe en esta memoria una molécula de unión, en donde la molécula de unión es un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), el anticuerpo aislado o un fragmento del mismo comprende:
- 35 i. una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 116 o variantes conservadoras de la misma y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 118 o variantes conservadoras de la misma o
- 40 ii. una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 142 o variantes conservadoras de la misma y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 144 o variantes conservadoras de la misma.
- También se describe en esta memoria una molécula de unión, en donde la molécula de unión es un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), el anticuerpo aislado o un fragmento del mismo comprende:
- 45 i. una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 120 o variantes conservadoras de la misma y
- 50 ii. una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 121 o variantes conservadoras de la misma y
- iii. una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 123 o variantes conservadoras de la misma y
- 55 iv. una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 124 o variantes conservadoras de la misma y
- 60 v. una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 125 o variantes conservadoras de la misma y
- vi. una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 127 o SEQ ID NO: 128 o SEQ ID NO: 129 o variantes conservadoras de la misma.
- 65 También se describe en esta memoria una molécula de unión, en donde la molécula de unión es un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), el anticuerpo aislado o un fragmento del mismo comprende un dominio variable de la cadena pesada que

comprende SEQ ID NO: 130 o variantes conservadoras de la misma y un dominio variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 132 o SEQ ID NO: 147 o SEQ ID NO: 153 o variantes conservadoras de la misma.

También se describe en esta memoria una molécula de unión, en donde la molécula de unión es un anticuerpo aislado que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18 / IL-18 (IL-18 BP), el anticuerpo aislado comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 134 o variantes conservadoras de la misma y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 136 o SEQ ID NO: 150 o SEQ ID NO: 156 o variantes conservadoras de la misma.

En otro aspecto, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica la molécula de unión de acuerdo con la invención.

En una realización de este aspecto posterior, el polinucleótido aislado de acuerdo con la invención comprende

SEQ ID NO: 15 o una secuencia al menos 90% idéntica a la misma; o

la SEQ ID NO: 17 o una secuencia al menos 90% idéntica a la misma; o

SEQ ID NO: 15 o una secuencia al menos 90% idéntica a la misma; y SEQ ID NO: 17 o una secuencia al menos 90% idéntica a la misma; o

SEQ ID NO: 44 o una secuencia al menos 90% idéntica a la misma; o

SEQ ID NO: 46 o una secuencia al menos 90% idéntica a la misma; o

SEQ ID NO: 44 o una secuencia al menos 90% idéntica a la misma; y SEQ ID NO: 46 o una secuencia al menos 90% idéntica a la misma.

También se describe en esta memoria el polinucleótido aislado que codifica un dominio variable de cadena pesada, en donde el polinucleótido:

i. es al menos 90% idéntico a SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 35 o SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 84 o SEQ ID NO: 88 o SEQ ID NO: 91 o SEQ ID NO: 94 o SEQ ID NO: 113 o SEQ ID NO: 131 o SEQ ID NO: 139 o SEQ ID NO: 146 o SEQ ID NO: 152; o

ii. comprende SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 35 o SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 84 o SEQ ID NO: 88 o SEQ ID NO: 91 o SEQ ID NO: 94 o SEQ ID NO: 113 o SEQ ID NO: 131 o SEQ ID NO: 139 o SEQ ID NO: 146 o SEQ ID NO: 152; o

iii. consiste esencialmente en SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 35 o SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 84 o SEQ ID NO: 88 o SEQ ID NO: 91 o SEQ ID NO: 94 o SEQ ID NO: 113 o SEQ ID NO: 131 o SEQ ID NO: 139 o SEQ ID NO: 146 o SEQ ID NO: 152.

También se describe en esta memoria el polinucleótido aislado que codifica un dominio variable de cadena ligera, en donde el polinucleótido:

i. es al menos 90% idéntico a SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 86 o SEQ ID NO: 89 o SEQ ID NO: 92 o SEQ ID NO: 95 o SEQ ID NO: 115 o SEQ ID NO: 133 o SEQ ID NO: 141 o SEQ ID NO: 148 o SEQ ID NO: 154; o

ii. comprende SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 86 o SEQ ID NO: 89 o SEQ ID NO: 92 o SEQ ID NO: 95 o SEQ ID NO: 115 o SEQ ID NO: 133 o SEQ ID NO: 141 o SEQ ID NO: 148 o SEQ ID NO: 154; o

iii. consiste esencialmente en SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 86 o SEQ ID NO: 89 o SEQ ID NO: 92 o SEQ ID NO: 95 o SEQ ID NO: 115 o SEQ ID NO: 133 o SEQ ID NO: 141 o SEQ ID NO: 148 o SEQ ID NO: 154.

También se describe en esta memoria el polinucleótido aislado que codifica una cadena pesada, en donde el polinucleótido:

i. es al menos 90% idéntico a SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 48 o SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 54 o SEQ ID NO: 57 o SEQ ID NO: 97 o SEQ ID NO: 101 o SEQ ID NO: 104 o SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 135 o SEQ ID NO: 143 o SEQ ID NO: 149 o SEQ ID NO: 155 o SEQ ID NO: 159; o

5 ii. comprende SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 48 o SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 54 o SEQ ID NO: 57 o SEQ ID NO: 97 o SEQ ID NO: 101 o SEQ ID NO: 104 o SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 135 o SEQ ID NO: 143 o SEQ ID NO: 149 o SEQ ID NO: 155 o SEQ ID NO: 159; o

10 iii. consiste esencialmente en SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 48 o SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 54 o SEQ ID NO: 57 o SEQ ID NO: 97 o SEQ ID NO: 101 o SEQ ID NO: 104 o SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 135 o SEQ ID NO: 143 o SEQ ID NO: 149 o SEQ ID NO: 155 o SEQ ID NO: 159.

También se describe en esta memoria el polinucleótido aislado que codifica una cadena ligera, en donde el polinucleótido:

15 i. es al menos 90% idéntico a SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 49 o SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 55 o SEQ ID NO: 58 o SEQ ID NO: 99 o SEQ ID NO: 102 o SEQ ID NO: 105 o SEQ ID NO: 119 o SEQ ID NO: 137 o SEQ ID NO: 145 o SEQ ID NO: 151 o SEQ ID NO: 157 o SEQ ID NO: 161; o

20 ii. comprende SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 49 o SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 55 o SEQ ID NO: 58 o SEQ ID NO: 99 o SEQ ID NO: 102 o SEQ ID NO: 105 o SEQ ID NO: 119 o SEQ ID NO: 137 o SEQ ID NO: 145 o SEQ ID NO: 151 o SEQ ID NO: 157 o SEQ ID NO: 161; o

25 iii. consiste esencialmente en SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 49 o SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 55 o SEQ ID NO: 58 o SEQ ID NO: 99 o SEQ ID NO: 102 o SEQ ID NO: 105 o SEQ ID NO: 119 o SEQ ID NO: 137 o SEQ ID NO: 145 o SEQ ID NO: 151 o SEQ ID NO: 157 o SEQ ID NO: 161.

En otro aspecto de este aspecto, se proporciona un vector de clonación o expresión que comprende uno o más polinucleótidos como se reivindica en esta memoria.

30 Se describe en esta memoria el vector de clonación o expresión que comprende al menos un polinucleótido seleccionado del grupo de SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 48 o SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 54 o SEQ ID NO: 57 o SEQ ID NO: 101 o SEQ ID NO: 159 o SEQ ID NO: 97 o SEQ ID NO: 104 o SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 143 o SEQ ID NO: 135 o SEQ ID NO: 149 o SEQ ID NO: 155 o SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 49 o SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 55 o SEQ ID NO: 58 o SEQ ID NO: 102 o SEQ ID NO: 161 o SEQ ID NO: 99 o SEQ ID NO: 105 o SEQ ID NO: 119 o SEQ ID NO: 145 o SEQ ID NO: 137 o SEQ ID NO: 151 o SEQ ID NO: 157.

La presente invención proporciona, además, una célula huésped que comprende uno o más vectores de clonación o expresión tal como se reivindica en esta memoria.

40 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una célula huésped transformada o transfectada de manera estable que comprende uno o más polinucleótidos tal como se reivindica en esta memoria.

45 La presente invención proporciona, además, un método para producir una molécula de unión, método que comprende cultivar una célula huésped tal como se reivindica en esta memoria en condiciones adecuadas para producir la molécula de unión.

50 En otro aspecto, la presente invención proporciona, además, una composición farmacéutica que comprende un soporte farmacéutico y la molécula de unión o el anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a IL-18 y que no se une a la proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL- 18 BP) y en donde la molécula de unión no es IL-18BP.

Preferiblemente, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención está en forma administrable por vía intravenosa, inhalable o subcutánea.

55 La presente invención proporciona, además, una molécula de unión que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde la molécula de unión no es IL-18BP o la composición farmacéutica que comprende esa molécula de unión para uso en terapia.

60 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una molécula de unión que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde la molécula de unión no es IL-18BP o la composición farmacéutica que comprende esa molécula de unión para uso en el tratamiento y/o la prevención de la sarcoidosis, en particular la sarcoidosis pulmonar, la linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH), la linfohistiocitosis hemofagocítica familiar (FHL) y otros síndromes de inmunodeficiencia, artritis de células gigantes (GCA), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedad de Still de inicio en adultos (AOSD), artritis idiopática juvenil sistémica (SJIA), asma grave, uveítis, atrofia geográfica, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 o aterosclerosis, y cualquier combinación de las mismas en un paciente mamífero.

En una realización de acuerdo con el uso de la presente invención, el paciente mamífero es un paciente humano.

La divulgación también proporciona un complejo que comprende IL-18 y una molécula de unión que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde la molécula de unión no es IL-18BP.

La divulgación también proporciona una molécula de unión o un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde la molécula de unión no es IL-18BP, para uso en diagnóstico o para uso en un kit de diagnóstico.

La divulgación también proporciona una molécula de unión o un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde la molécula de unión no es IL-18BP, para uso en diagnóstico o para uso en detectar y/o medir la presencia y/o la cantidad de IL-18 libre (es decir, IL-18 no unida a IL-18BP) en una muestra.

En aún un aspecto adicional de la presente divulgación, se proporciona un método para detectar y/o medir la presencia y/o cantidad de IL-18 libre (es decir, IL-18 no unida a IL-18BP) en una muestra, en donde la muestra es opcionalmente una muestra humana, en donde el método comprende poner en contacto la muestra con la molécula de unión o el anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde la molécula de unión no es IL-18BP.

En una realización de este aspecto, la muestra es sangre humana.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona, además, un kit de diagnóstico que comprende la molécula de unión o el anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde la molécula de unión no es IL-18BP y/o el complejo que comprende IL-18 y esa molécula de unión en la que el kit comprende opcionalmente un primer compuesto de control.

En una realización de este aspecto, el primer compuesto de control es IL-18 libre y el kit comprende opcionalmente un segundo compuesto de control que es el anticuerpo murino 125-2H.

En otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un dispositivo médico o de diagnóstico que comprende la molécula de unión o el anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a IL-18 y que no se une a la proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde la molécula de unión no es IL-18BP y/o el complejo que comprende IL-18 y esa molécula de unión.

Breve Descripción de los Dibujos

Figura 1: CDRs de las regiones variables de las cadenas pesadas de los anticuerpos ejemplificados en esta memoria.

Figura 2: CDRs de las regiones variables de las cadenas ligeras de los anticuerpos ejemplificados en esta memoria.

Figura 3 (A-D) Efecto de anticuerpos anti-IL18 y fragmentos de los mismos de la presente invención en la liberación de IFN- γ a partir de PBMCs inducido por LPS/IL-12 (estimulación por IL-18 nativa). Los datos muestran la inhibición dependiente de la concentración de la liberación de IFN- γ inducida por IL-18 a partir de PBMCs humanas recién aisladas de donantes individuales, en que cada uno de los puntos de datos representa la media $\pm$ EMT de $n = 4$ pocillos. La IL-18 nativa fue estimulada por tratamiento con LPS/IL-12 y la línea de puntos representa el grado de dependencia de IL-18, según se determina por la eficacia máxima de IL-18BP α -Fc humana.

Figura 4 (A-B) Efecto de anticuerpos anti-IL18 y fragmentos de los mismos de la presente invención en la liberación de IFN- γ a partir de PBMCs inducido por IL-18 recombinante. Los datos muestran la inhibición dependiente de la concentración de la liberación de IFN- γ inducida por IL-18 (1 nM) a partir de PBMCs humanas recién aisladas de donantes individuales representativos, en que cada uno de los puntos de datos representa la media $\pm$ EMT de $n = 4$ pocillos.

Figura 5 (A-C) Efecto de anticuerpos anti-IL18 y fragmentos de los mismos de la presente invención en la liberación de IFN- γ a partir de células KG-1 inducido por IL-18 humana. Los datos muestran la inhibición dependiente de la concentración de la liberación de IFN- γ inducida por IL-18 (1 nM) humana recombinante a partir de células KG-1, en que cada uno de los puntos de datos representa la media $\pm$ EMT de $n = 4$ pocillos.

Figura 6 (A-C) Efecto de anticuerpos anti-IL18 y fragmentos de los mismos de la presente invención en la liberación de IFN- γ a partir de células KG-1 inducido por IL-18 de cynomolgus. Los datos muestran la inhibición dependiente de la concentración de la liberación de IFN- γ inducida por IL-18 (0,2 nM) de cynomolgus recombinante a partir de células KG-1, en que cada uno de los puntos de datos representa la media $\pm$ EMT de $n = 4$ pocillos.

Figura 7 (A-E) Efecto de anticuerpos anti-IL-18 y fragmentos de los mismos de la presente invención en la IL-18 humana inducida por LPS/IL-12 (estimulación de IL-18 nativa) y la posterior liberación de IFN- γ en sangre entera humana.

Figura 8 (A-E) Efecto de anticuerpos anti-IL18 y fragmentos de los mismos de la presente invención en la liberación de IFN- γ inducida por IL-18 humana en sangre entera humana. Los datos muestran la inhibición dependiente de la

concentración de la liberación de IFN - γ inducida por IL-18 humana recombinante a partir de sangre entera tomada de donantes individuales, en que cada uno de los puntos de datos representa la media $\pm$ EMT de $n = 4$ pocillos.

Figura 9 (A-B) Unión de anticuerpos anti-IL-18 y fragmentos al complejo IL-18/IL-18BP. (A) MOR08775 y MOR08776 parentales no reconocen el complejo IL-18/IL-18BP. En este experimento, MOR08775 y MOR08776 se incubaron con el complejo IL-18/IL-18BP biotinilado. (B) El experimento se realizó de manera similar a como se muestra en A), excepto por el uso de IL-18 humana no biotinilada. MOR03207 es un anticuerpo anti-lisozima y 125-2H es IgG de ratón anti-IL-18 que se une al complejo IL-18 / IL-18BP.

Figura 10: Agrupación de epítomos para anticuerpos MOR8775, MOR8776 anti-IL-18 (A) y para anticuerpos MOR9464, MOR9464_N30K, MOR10222_N30S_M54I y MOR14431 (B) los rellenos de las células negros indican anticuerpos que compiten por un epítomo similar, mientras que los no rellenos de las células indican que no hay competencia.

Figura 11 (A-B) A) Estructura del complejo IL-1 β /IL-1R superpuesto sobre el modelo de IL-18/IL-18R α creado en la estructura del complejo IL-1 β /IL-1R. Todas las estructuras han sido representadas como cinta. Las estructuras de IL-18 e IL-1 β se han utilizado para la superposición. B) Modelo del complejo IL-18/IL-18R α creado en la estructura del complejo IL-1 β /IL-1R. IL-18R α (mostrado en la representación de la superficie) comprende tres dominios de tipo inmunoglobulina, D1, D2 y D3. En IL-18 (mostrado en la representación de la cinta) los sitios 1 y 2 son los sitios de unión a IL-18R α . El sitio 3 es el sitio de unión a IL-18R β .

Figura 12: Comparaciones de los aminoácidos relevantes unidos en IL-18. 1) Secuencia de IL-18 con referencia a SEQ ID NO: 1 de los aminoácidos 37 a 193. 2) de Kim et al., (2000) Proc Natl Acad Sci; 97(3):1190-1195 (modelado de IL-18BP y su complejo con IL-18 humana). 3) de Krumm et al. I , (2008) Proc Natl Acad Sci; 2008, 105(52):, 20711-2071552, Tabla 1. 4) de Kato et al., (2003) Nature Struct. Biol. 2003; 10(11): 966-971; residuos implicados en la unión de IL-18R α . 5) Resultados de H/DxMS para MOR9464 unido a IL-18.

Figura 13: Vista general de la estructura tridimensional del complejo entre IL-18 humana (mostrada en el rastro de Ca y la superficie accesible al disolvente) y MOR9464_N30K (mostrada en la representación en caricatura).

Figura 14: (A) alineamiento de secuencia de las secuencias de IL-18 humana y de cynomolgus madura (del aminoácido 37 al 193); (B) Representación de relleno de espacio de los 6 aminoácidos que difieren entre las dos especies. E177 es el único presente en la interfaz del complejo de anticuerpos. IL-18 se muestra en el rastro de Ca y superficie accesible al disolvente y MOR9464_N30K se muestra en representación de caricatura.

Figura 15: Representación de la cinta del complejo IL18/ MOR9464_N30K superpuesto sobre el modelo del complejo IL-18/IL-18R α creado en la estructura del complejo IL-1 β /IL-1R. La estructura de IL-18R α se muestra con una representación en superficie y las cadenas pesada y ligera MOR9464_N30K están en gris oscuro y gris claro, respectivamente.

Figura 16: Representación de la cinta de IL-18 humana unida a IL-18 BP del poxvirus (izquierda) y al fragmento de anticuerpo MOR9464_N 30K (derecha) y su superposición (centro). La superposición se basa en la estructura IL-18. IL-18 se muestra en el rastro de Ca y superficie accesible al disolvente y MOR9464_N30K e IL-18BP se muestran en representación de caricatura.

Figura 17: Representación de la cinta de IL-18 humana unida al fragmento de anticuerpo MOR9464_N30K (derecha) y al fragmento de anticuerpo murino 125-2H (derecha) y su superposición (centro). La superposición se basa en la estructura de IL-18. IL-18 se muestra en el rastro de Ca y superficie accesible al disolvente y MOR9464_N30K y 125-2H se muestran en representación de caricatura.

Figura 18: Representación de la cinta de IL-18 humana unida a 125-2H superpuesta sobre IL-18 unida a IL-18BP del poxvirus. La superposición se basa en la estructura de IL-18. IL-18 se muestra en el rastro de Ca y superficie accesible al disolvente y MOR9464_N30K, 125-2H e IL-18BP de poxvirus se muestran en representación de caricatura.

Figura 19: Representación de la cinta de IL-18 humana unida al fragmento de anticuerpo MOR9464_N30K, con residuos de epítomo y parátipo representados en representación en barra, que muestra la interacción específica con el aminoácido lisina en la posición 30 de MOR9464_N30K.

Descripción Detallada de la Invención

1. Definiciones

A efectos de interpretación de esta memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones y, cuando proceda, las expresiones y los términos utilizados en singular también incluirán el plural y viceversa. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

El término "IL-18" es sinónimo de polipéptido IL-18, polipéptido de interleuquina-18, factor inductor de IFN-gamma o factor inductor de interferón-gamma o factor inductor de INF - γ . El término "IL-18" se refiere a la IL-18 humana que comprende los aminoácidos 37 a 193 de SEQ ID NO: 1. A lo largo de esta memoria descriptiva, el término IL-18 abarca tanto pro-IL-18 (precursor de la IL-18 madura previa a la escisión de proteasa) e IL-18 madura (escisión posterior a la proteasa) indistintamente, a menos que se especifique que se entiende la forma pro o madura.

El término cm IL-18 se refiere a IL-18 del mono cynomolgus que comprende los aminoácidos 37 a 193 de SEQ ID NO: 2.

El término "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina intacta o un fragmento funcional de la misma. Anticuerpos que se producen de forma natural comprenden típicamente un tetrámero que habitualmente está compuesto de al

menos dos cadenas pesadas (H) y al menos dos cadenas ligeras (L). Cada una de las cadenas pesadas está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada en esta memoria como VH) y una región constante de la cadena pesada, habitualmente compuesta por tres dominios (CH1, CH2 y CH3). Las cadenas pesadas pueden ser de cualquier isotipo, incluidas IgG (subtipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA (subtipos IgA1 e IgA2), IgM e IgE. Cada una de las cadenas ligeras está compuesta por una región variable de la cadena ligera (abreviada en esta memoria como VL) y una región constante de la cadena ligera (CL). La cadena ligera incluye cadenas kappa y cadenas lambda. La región variable de la cadena pesada y ligera es típicamente responsable del reconocimiento de antígeno, mientras que la región constante de la cadena pesada y ligera puede mediar en la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluidas diversas células del sistema inmune (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico. Las regiones VH y VL se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de entramado (FR). Cada una de las VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno.

La expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de antígeno") tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la longitud completa o a uno o más fragmentos completos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a IL-18. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados por la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; un fragmento F(ab)2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región de bisagra; un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; un fragmento dAb (Ward et al., (1989) *Nature*; 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y una región determinante de complementariedad (CDR) aislada.

Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador flexible que les permite formarse como una cadena de proteínas única en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véanse, p. ej., Bird et al., (1988) *Science* 242:423-426; y Huston et al., (1988) *Proc Natl Acad Sci*; 85:5879-5883). Se pretende que dichos anticuerpos de cadena sencilla también estén englobados dentro de la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se rastrean en cuanto a su utilidad de la misma manera que para los anticuerpos intactos.

El término "aislado" significa a lo largo de esta memoria descriptiva, que la inmunoglobulina, el anticuerpo o el polinucleótido, según sea el caso, existe en un medio físico distinto del que se puede producir en la naturaleza.

Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente al polipéptido IL18 puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como IL18 de otras especies (p. ej., IL-18 de mono cynomolgus (cm)). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

A lo largo de esta memoria descriptiva, las regiones determinantes de complementariedad ("CDR") se definen de acuerdo con la definición de Kabat, a menos que se especifique que las CDR se definen de acuerdo con la definición de Chothia o por ambas definiciones juntas. La definición de Kabat es un patrón para numerar los residuos en un anticuerpo y se utiliza típicamente para identificar regiones CDR (Kabat et al., (1991), 5ª edición, publicación NIH N° 91-3242). La definición de Chothia es similar a la definición de Kabat, pero tiene en cuenta las posiciones de determinados bucles estructurales (Chothia et al., (1987) *J. Mol. Biol.*, 196:901-17; Al-Lazikani et al., (1997) *J. Mol. Biol.* 273:927-948).

Por convención, a las regiones CDR en la cadena pesada se las alude típicamente como H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 y en la cadena ligera como L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3. Se numeran secuencialmente en la dirección del extremo amino al extremo carboxi.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" tal como se utilizan en esta memoria, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal tiene una sola especificidad y afinidad de unión por un epítipo particular.

La expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en esta memoria, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las que las regiones tanto del marco como de CDR se derivan de secuencias de origen humano. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de estas secuencias humanas, p. ej., secuencias de la línea germinal humana, o versiones mutadas de secuencias de la línea germinal humana o anticuerpos que contienen secuencias marco consensuadas derivadas del análisis de secuencias marco humanas, por ejemplo, tal como se describe en Knappik, et al., (2000) *J Mol Biol*; 296:57-86).

Los anticuerpos humanos de la divulgación pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas (p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica para el sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, no se pretende que la expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en esta memoria, incluya anticuerpos en los que se han injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, en secuencias marco humanas.

La expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una especificidad de unión única que tienen regiones variables en las que las regiones tanto del marco como de CDR se derivan de secuencias humanas.

La expresión "anticuerpo humano recombinante", tal como se utiliza en esta memoria, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de un animal (p. ej., un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana, o un híbrido preparado a partir de ellos, anticuerpos aislados de una célula huésped transformados para expresar el anticuerpo humano, p. ej., de un transfectoma, anticuerpos aislados de una colección de anticuerpos humanos recombinante, combinatoria, y anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique unir todo o una parte de un gen de inmunoglobulina humana. Anticuerpos humanos recombinantes de este tipo tienen regiones variables en las que las regiones marco y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Sin embargo, en determinadas realizaciones, anticuerpos humanos recombinantes de este tipo pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan y están relacionadas con secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Las expresiones "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se utilizan indistintamente en esta memoria con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

Tal como se utiliza en esta memoria, una molécula de unión que "se une específicamente a IL-18" pretende referirse a una molécula de unión que se une a IL-18 humana con una K_D de 100 nM o menos, 10 nM o menos, 1 nM o menos.

Una molécula de unión que "reacciona de forma cruzada con un antígeno distinto de IL-18" pretende referirse a una molécula de unión que se une a ese antígeno con una K_D de 100 nM o menos, 10 nM o menos, 1 nM o menos. Una molécula de unión que "no reacciona de forma cruzada con un antígeno particular" pretende referirse a una molécula de unión que exhibe una unión esencialmente indetectable contra estas proteínas en ensayos de unión estándar.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "antagonista" pretende referirse a una molécula de unión que inhibe la actividad de señalización dependiente de IL-18 en presencia de IL-18 en un ensayo de células humanas tal como el ensayo de producción de interferón gamma (IFN- γ) dependiente de IL-18 en células de la sangre humanas. Ejemplos de un ensayo de producción de IFN- γ dependiente de IL-18 - γ en células de la sangre humanas se describen con más detalle en los ejemplos que figuran más adelante.

Tal como se utiliza en esta memoria, un anticuerpo con "actividad no agonista" pretende referirse a una molécula de unión que no aumenta significativamente la actividad de señalización dependiente de IL-18 en ausencia y/o presencia de IL-18 en un ensayo basado en células, tal como el ensayo de producción de IFN- γ de células de la sangre humanas. Dichos ensayos se describen con más detalle en los ejemplos que figuran más adelante.

El término " K_{asoc} " o " K_a ", tal como se utiliza en esta memoria, pretende referirse a la tasa de asociación de una interacción de molécula de unión-antígeno particular, mientras que el término " K_{dis} " o " K_d ", pretende referirse a la tasa de disociación de una interacción de molécula de unión-antígeno particular. El término " K_D ", tal como se utiliza en esta memoria, pretende hacer referencia a la constante de disociación, que se obtiene de la relación de K_d a K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de K_D para los anticuerpos se pueden determinar utilizando métodos muy consolidados en el técnica. Un método para determinar la K_D de un anticuerpo es mediante el uso de resonancia del plasmón de superficie, tal como un sistema Biacore®.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "afinidad" se refiere a la fuerza de interacción entre la molécula de unión y el antígeno en sitios antígenicos únicos.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "alta afinidad" para un anticuerpo se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 1 nM o menos para un antígeno diana.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano.

La expresión "animal no humano" incluye todos los vertebrados, p. ej., mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, gallinas, anfibios, reptiles, etc.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "secuencia de nucleótidos optimizada" significa que la secuencia de nucleótidos ha sido alterada para codificar una secuencia de aminoácidos utilizando codones que se prefieren en la célula u organismo de producción, generalmente una célula eucariota, por ejemplo, una célula de *Pichia pastoris*, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula humana. La secuencia de nucleótidos optimizada está diseñada para retener completamente la secuencia de aminoácidos originalmente codificada por la secuencia de nucleótidos de partida, que también se conoce como la secuencia "parental". Las secuencias optimizadas en el presente documento han sido diseñadas para tener codones que se prefieren en células de mamífero CHO; sin embargo, también se contempla en esta memoria la expresión optimizada de estas secuencias en otras células eucariotas.

El término "identidad" se refiere a la similitud entre al menos dos secuencias diferentes. Esta identidad puede expresarse como un porcentaje de identidad y determinarse mediante algoritmos de alineamiento estándares, por ejemplo, la Basic Local Alignment Tool (BLAST) (Altschul et al., (1990) *J Mol Biol*; 215: 403-410); el algoritmo de Needleman et al., (1970) *J Mol Biol*; 48:444-453 o el algoritmo de Meyers et al., (1988) *Comput Appl Biosci*; 4:11-17). Un conjunto de parámetros puede ser la matriz de puntuación Blosum 62 con una penalización por hueco de 12, una penalización por extensión de hueco de 4 y una penalización por hueco de desplazamiento del marco de 5. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos también se puede determinar utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller, (1989) *CABIOS*; 4(1):1-17 que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos de peso PAM 120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. El porcentaje de identidad generalmente se calcula mediante la comparación de secuencias de longitud similar.

La expresión "respuesta inmunitaria" se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígeno, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluyendo anticuerpos, citocinas y el complemento) que provoca daño selectivo en, destrucción o eliminación del organismo humano de los patógenos invasores, las células o tejidos infectados con patógenos, las células cancerosas o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Una "ruta de transducción de señales" o "actividad de señalización" se refiere a una relación causal bioquímica generalmente iniciada mediante una interacción de proteína-proteína tal como la unión de un factor de crecimiento a un receptor, que provoca la transmisión de una señal desde una parte de una célula hasta otra parte de una célula. En general, la transmisión implica fosforilación específica de uno o más restos de tirosina, serina o treonina en una o más proteínas en la serie de reacciones que causa la transducción de señales. Los penúltimos procesos incluyen generalmente eventos nucleares, que provocan un cambio en la expresión génica.

El término "neutraliza" y sus variaciones gramaticales significan a lo largo de esta memoria descriptiva que la actividad biológica de la diana se reduce total o parcialmente en presencia de la proteína o anticuerpo de unión, según sea el caso.

La expresión "ácido nucleico" o el término "polinucleótido" se refiere a ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) y sus polímeros en forma de cadena sencilla o de doble cadena. A menos que esté específicamente limitado, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y se metabolizan de una manera similar a los nucleótidos que se producen de forma natural. A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácidos nucleicos también abarca implícitamente variantes modificadas de forma conservativa de la misma (p. ej., sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNPs y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, se pueden conseguir sustituciones de codones degenerados generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o su totalidad) se sustituya con una base mixta y/o residuos de desoxiinosina (Batzner et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985) y Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

El nucleótido en el "polinucleótido" o "ácido nucleico" puede comprender modificaciones que incluyen modificaciones de bases tales como derivados de bromouridina e inosina, modificación de ribosa, tal como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotoato, fosforaniladato y fosfoamidato.

El término "vector" significa cualquier molécula o entidad (p. ej., ácido nucleico, plásmido, bacteriófago o virus) que es adecuada para la transformación o transfección de una célula huésped y que contiene secuencias de ácido nucleico que dirigen y/o controlan (en unión con la célula huésped) la expresión de una o más regiones codificantes heterólogas unidas operativamente a las mismas.

Una "variante conservadora" de una secuencia que codifica una molécula de unión, un anticuerpo o un fragmento del mismo se refiere a una secuencia que comprende modificaciones conservadoras de aminoácidos. "Modificaciones conservadoras de aminoácidos" pretenden referirse a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Modificaciones conservadoras de este tipo incluyen sustituciones, adiciones y delecciones de aminoácidos. Sustituciones conservadoras de aminoácidos son aquellas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido las familias de residuos

aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales de carácter básico (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales de carácter ácido (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales apolares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales con ramificaciones beta (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Pueden introducirse modificaciones en una proteína de unión de la divulgación mediante técnicas estándares conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. La sustitución conservadora de aminoácidos también puede abarcar residuos aminoácidos que se producen de forma no natural que se incorporan típicamente por síntesis química de péptidos en lugar de por síntesis en sistemas biológicos. Los aminoácidos que se producen de forma no natural incluyen, pero no se limitan a formas peptidomiméticas, revertidas o invertidas de restos aminoácidos.

El término "epítipo" es la parte de un antígeno que es reconocida por el sistema inmune, tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo. Dentro de la presente memoria descriptiva, el término "epítipo" se utiliza indistintamente tanto para epítopos conformacionales como para epítopos lineales. Un epítipo conformacional se compone de secciones discontinuas de la secuencia de aminoácidos del antígeno, mientras que un epítipo lineal está formado por una secuencia continua de aminoácidos del antígeno.

Los términos y expresiones "tratar", "que trata", "tratamiento", "prevenir", "que previene" o "prevención" incluyen tratamientos terapéuticos, tratamientos profilácticos y aplicaciones en las que se reduce el riesgo de que un sujeto desarrolle un trastorno u otro factor de riesgo. El tratamiento no requiere la curación completa de un trastorno y abarca la reducción de los síntomas o los factores de riesgo subyacentes.

2. Moléculas de unión

La expresión "molécula de unión", tal como se utiliza en esta memoria, significa cualquier proteína o péptido que se une específicamente al polipéptido IL-18. La expresión "molécula de unión" incluye, pero no se limita a anticuerpos y fragmentos de la misma, tales como fragmentos inmunológicamente funcionales. La expresión "fragmento inmunológicamente funcional" de un anticuerpo o cadena de inmunoglobulina, tal como se utiliza en esta memoria, es una especie de proteína de unión que comprende una porción (independientemente de cómo se obtenga o sintetice esa porción) de un anticuerpo que carece de al menos algunos de los aminoácidos presentes en una cadena de longitud completa, pero que todavía es capaz de unirse específicamente al polipéptido IL-18. Dichos fragmentos son biológicamente activos porque se unen al polipéptido IL-18. "Molécula de unión" se refiere a proteínas que se unen específicamente al polipéptido IL-18 y que adicionalmente pueden neutralizar la interacción del polipéptido IL-18 con el receptor de IL-18.

La expresión "molécula de unión", tal como se utiliza en esta memoria, también excluye la proteína de unión a IL-18 que se produce de forma natural y la IL-18BP aislada, por ejemplo tal como se describe en el documento WO2001/085201.

La molécula de unión de la presente divulgación se une específicamente a IL-18, en donde la molécula de unión no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde la molécula de unión no es IL-18BP.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "no se une al complejo de la proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP)" se refiere a una molécula de unión que se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) con una K_D de $1 \times 10^{-5}M$ o mayor.

Un modo de evaluar si una molécula de unión se une a IL-18 pero no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) se describe en esta memoria en la Sección 9 de Ejemplificación.

En otro aspecto de la presente divulgación, la molécula de unión se une específicamente a IL-18, en donde la molécula de unión no compite con la proteína de unión a IL-18 (IL-18 BP) para unirse a IL-18 cuando IL-18BP se une a IL-18.

El término "compite", "competir" y la expresión "competir de forma cruzada" y variaciones gramaticales de los mismos se utilizan indistintamente en esta memoria para dar a entender la capacidad de una molécula de unión de competir con la IL-18BP por la unión a IL-18 cuando la IL-18BP ya está unida a IL-18. Las moléculas de unión de la divulgación, tales como un anticuerpo o un fragmento del mismo, no compiten en este sentido. La competencia entre las moléculas de unión se determina mediante un ensayo en el que se testa la molécula de unión en cuanto a la unión específica a IL-18 cuando IL-18 se une a IL-18BP. Para evitar cualquier duda, si una molécula de unión puede desplazar a IL-18 de un complejo de IL-18/IL-18BP, entonces esa molécula de unión compite con la IL-18 BP por unirse a IL-18.

La molécula de unión de acuerdo con la divulgación no es IL-18BP, ya sea IL-18BP aislada o que se produce de forma natural.

La molécula de unión se puede seleccionar de los siguientes armazones: un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo, un anticuerpo de dominio variable único, un anticuerpo biespecífico o multiespecífico, un anticuerpo

multivalente, un anticuerpo de dominio variable doble, un inmunoconjugado, una molécula de fibronectina, una adnectina, un DARPin, un avímero, un aficuerpo, una anticalina, una afilina, un mimético de epítipo proteico o combinaciones de los mismos y tal como se describe más adelante en esta memoria .

- 5 Preferiblemente, la IL-18 comprende del aminoácido 37 al aminoácido 193 de SEQ ID NO: 1 (IL-18 humana) o SEQ ID NO: 2 (IL-18 de mono cynomolgus).

La estructura de IL-18BP se caracteriza por un solo dominio de tipo Ig y se asemeja al segmento extracelular de los receptores de citoquinas con estructuras de tipo Ig. La IL-18BP humana se ha identificado en cuatro isoformas diferentes. La isoforma a de IL-18BP (IL-18BP_a) exhibió la mayor afinidad por IL-18 con una velocidad de activación rápida, una velocidad de desactivación lenta y una constante de disociación (K_D) de 399 pM. La isoforma c de IL-18BP (IL-18BP_c) comparte el dominio de Ig de IL-18BP_a, a excepción de los últimos 29 aminoácidos en el extremo C. La K_D de IL-18BP_c es 10 veces menor (2,94 nM) que IL-18BP_a. No obstante, IL-18BP_a e IL-18BP_c neutralizan IL-18 en > 95% con un exceso molar de dos. Las isoformas de IL-18BP b y d carecen de un dominio de Ig completo y carecen de la capacidad de unirse o neutralizar IL-18. La IL-18BP murina se conoce en dos isoformas, las isoformas c y d, que poseen dominios de Ig idénticos y también neutralizan > 95% de IL-18 murina con un exceso molar de dos. Sin embargo, la IL-18BP_d murina, que comparte un motivo C-terminal común con IL-18BP_a humana, también neutraliza la IL-18 humana (Kim et al. (2000) Proc Natl Acad Sci, 97(3):1190-1195).

A lo largo de esta memoria descriptiva, el término "IL-18BP" se refiere a proteínas de unión a IL-18 humanas, murinas o virales en cada una de las isoformas, ya sea de origen natural, aislada o modificada, tal como la IL-18BP descrita en el documento WO2001/085201 que describe análogos de IL-18BP ("muteínas"), en donde se insertan uno o más aminoácidos, reemplazados por diferentes sustituciones conservadoras o proteína fusionada IL-18BP suprimida (p. ej., proteína fusionada de una IL-18BP y una región de cadena pesada de inmunoglobulina o Fc) y derivados funcionales tales como IL-18BP PEG-ilada.

En una realización, la molécula de unión de acuerdo con la invención, que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde la molécula de unión no es IL-18BP, en donde la molécula de unión se une con un epítipo de IL-18 en IL-18 tal como se define con referencia a SEQ ID NO: 1, en donde el epítipo:

- a. está comprendido dentro de los siguientes aminoácidos de IL-18 tal como se define con referencia a SEQ ID NO: 1:
 - 35 aminoácidos 41 y 42 y aminoácidos 87 a 97; o
 - ii. aminoácidos 138 a 160; o
 - iii. aminoácidos 177 a 181; o
 - 40 iv. aminoácidos 41 y 42, aminoácidos 87 a 97, aminoácidos 138 a 160 y aminoácidos 177 a 181; o
 - v. aminoácidos 41, 42, 87; 89; 90; o
 - 45 vi. aminoácidos 93, 94; 95, 96; o
 - vii. aminoácidos 140; 141; 150; 177; o
 - viii. aminoácidos 92; 93; 94; 138; 140; 152; 157; o
 - 50 ix. aminoácidos 142; 143; 150; 152; o
 - x. aminoácidos 143, 144, 145; 177; 180; o
 - 55 xi. aminoácidos 41, 42, 87; 89; 90; 93, 94; 95, 96; 140; 141; 150; 177; o
 - xii. aminoácidos 92; 93; 94; 138; 140; 142; 143; 144; 145; 150; 152; 157; 177; 180; o
 - xiii. aminoácidos 41; 42, 87; 89; 90; 92; 93, 94; 95, 96; 138; 140; 141; 142; 143; 144; 145; 150; 152; 157; 177; 180; o
 - 60 b. comprende al menos uno, dos, tres, cuatro de los aminoácidos como se define en uno cualquiera de los grupos (i) a (xiii) enumerados en a); o
 - 65 c. comprende los aminoácidos como se define en uno cualquiera de los grupos (iv) a (xii) enumerados en a).

En otra realización, la molécula de unión de acuerdo con la invención, que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde la molécula de unión no es IL-18BP, en donde la molécula de unión se une con un epítipo de IL-18 en IL-18 tal como se define con referencia a SEQ ID NO: 1, en donde el epítipo comprende los aminoácidos Arg140 y Glu152. En una realización, el epítipo comprende, además, uno cualquiera o más de los aminoácidos Gln92, Pro93, Gly95, Pro143, Glu157 o Glu177. En otra realización, el epítipo comprende, además, uno cualquiera o más de los aminoácidos Lys89, Arg94, Met96, Phe138, Ser141, Gly144, His145, Asp146, Gln150 o Leu180.

En una realización de la presente invención, la molécula de unión se une específicamente a IL-18, en donde la molécula de unión no se une al complejo de isoforma a de la proteína de unión a IL-18/IL-18 o isoforma c (IL-18 BP a o IL-18BPc), en donde la molécula de unión se selecciona de: un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo, un anticuerpo de dominio variable único, un anticuerpo biespecífico o multiespecífico, un anticuerpo multivalente, un anticuerpo de dominio variable doble, un inmuno-conjugado, una molécula de fibronectina, una adnectina, un DARPin, un avímero, un aficuerpo, una anticalina, una afillina, un mimético de epítipo proteico o combinaciones de los mismos. Preferiblemente, la IL-18 comprende del aminoácido 37 al aminoácido 193 de SEQ ID NO: 1 (IL-18 humana) o SEQ ID NO: 2 (IL-18 de mono cynomolgus). Más preferiblemente, la molécula de unión es un anticuerpo o un fragmento del mismo.

En otra realización, la molécula de unión de acuerdo con la invención, que se une a IL-18 y que no se une a la proteína isoforma a o la isoforma c de IL-18/IL-18 (IL-18 BP a o IL-18BPc) y en donde el la molécula de unión no es IL-18BP, en donde la molécula de unión se une con un epítipo de IL-18 en IL-18 como se define con referencia a SEQ ID NO: 1, en donde el epítipo comprende los aminoácidos Arg140 y Glu152. En una realización, el epítipo comprende, además, uno cualquiera o más de los aminoácidos Gln92, Pro93, Gly95, Pro143, Glu157 o Glu177 y en donde la molécula de unión se selecciona de: un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo, un anticuerpo de dominio variable único, un anticuerpo biespecífico o multiespecífico, un anticuerpo multivalente, un anticuerpo de dominio variable doble, un inmunoconjugado, una molécula de fibronectina, una adnectina, un DARPin, un avímero, un aficuerpo, una anticalina, una afillina, un mimético de epítipo proteico o combinaciones de los mismos.

En otra realización, la molécula de unión de acuerdo con la invención, que se une a IL-18 y que no se une a la proteína isoforma a o la isoforma c de IL-18/IL-18 (IL-18 BP a o IL-18BPc) y en donde el la molécula de unión no es IL-18BP, en donde la molécula de unión se une con un epítipo de IL-18 en IL-18 como se define con referencia a SEQ ID NO: 1, en donde el epítipo comprende los aminoácidos Arg140 y Glu152 y en donde la molécula de unión es un anticuerpo o un fragmento del mismo. En esta realización, el epítipo puede comprender, además, uno cualquiera o más de los aminoácidos Gln92, Pro93, Gly95, Pro143, Glu157 o Glu177.

La molécula de unión de la invención es capaz de inhibir una o más de las actividades biológicas de IL-18, tales como la modulación de Th1; la modulación de Th2, modulación de NK, modulación de neutrófilos, modulación de linaje de monocitos-macrófagos, modulación de eosinófilos, modulación de células B, modulación de citoquinas, modulación de quimioquinas; modulación de la molécula de adhesión y modulación del reclutamiento celular. En una realización, la molécula de unión de la invención inhibe la producción de interferón gamma (INF- γ) dependiente de IL-18, preferiblemente en células KG-1. En otra realización de la invención, la molécula de unión inhibe la producción de interferón gamma (INF- γ) dependiente de IL-18 en células KG-1 con una CI_{50} de 10 nM o menos, o de 1 nM o menos, o de 100 pM o menos en una ensayo tal como se define en esta memoria más adelante en los ejemplos.

La molécula de unión de la invención que se une específicamente a IL-18 tiene una constante de disociación (K_D) de 10 nM o menos en un ensayo tal como se define en esta memoria más adelante en los ejemplos. En una realización, la K_D es de 1 nM o menos. En otra realización, la molécula de unión tiene una K_D de 100 pM o menos y la molécula de unión es un anticuerpo o un fragmento del mismo.

La molécula de unión de acuerdo con la divulgación puede ser una molécula de unión cristalizada, preferiblemente una molécula de unión cristalizada de liberación controlada y/o libre de soporte. En una realización, la molécula de unión cristalizada es un anticuerpo o un fragmento del mismo. En otra realización, la molécula de unión cristalizada tiene una semivida mayor in vivo que la equivalente soluble y conserva su función biológica después de la cristalización.

La molécula de unión de acuerdo con la divulgación también puede ser parte de un complejo que comprende la molécula de unión e IL-18. Preferiblemente, la molécula de unión es un anticuerpo o un fragmento del mismo en complejo con IL-18.

Finalmente, la molécula de unión de acuerdo con la divulgación también puede competir con el anticuerpo murino 125-2H para unirse a IL-18 humana.

2) Anticuerpos

Las moléculas de unión de acuerdo con la presente invención incluyen anticuerpos o fragmentos de los mismos, aislados y caracterizados estructuralmente tal como se describe más adelante en esta memoria y como se muestra en las Figuras 1 y 2.

5 2.1) Anticuerpos humanos

Tal como se utiliza en esta memoria, un anticuerpo humano o un fragmento del mismo comprende regiones variables de cadena pesada o ligera o cadenas pesadas o ligeras de longitud completa que son "el producto de" o "derivadas de" una secuencia de línea germinal particular si las regiones variables o cadenas de longitud completa de los anticuerpos se obtienen de un sistema que utiliza genes de inmunoglobulina de línea germinal humana. Sistemas de este tipo incluyen la inmunización de un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o el rastreo de la colección de genes de inmunoglobulina humana mostrada en el fago con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano o fragmento del mismo que es "el producto de" o "deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana puede identificarse como tal comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de la línea germinal humana y seleccionando las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana que es más cercana en secuencia (es decir, mayor % de identidad) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "deriva de" una secuencia de la línea germinal humana particular puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la línea germinal debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas de origen natural o introducción intencionada de mutación dirigida al sitio. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado típicamente es al menos un 90 % idéntico en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana y contiene restos aminoácídicos que identifican el anticuerpo humano como humano en comparación con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de la línea germinal de otras especies (p. ej., secuencias de la línea germinal murina). En determinados casos, un anticuerpo humano puede ser al menos 60%, 70%, 80%, 90% o al menos 95%, o incluso al menos 96%, 97%, 98% o 99% idéntico en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. Típicamente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia de la línea germinal humana particular presentará no más de 10 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En determinados casos, el anticuerpo humano puede tener no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2 o 1 diferencias de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal.

Los anticuerpos humanos se pueden producir mediante un cierto número de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los anticuerpos humanos se pueden hacer mediante el método de hibridoma utilizando líneas de células de mieloma humano o heteromieloma de ratón-humano (Kozbor, J Immunol; (1984) 133:3001; Brodeur, Monoclonal Isolated Antibody Production Techniques and Applications, págs. 51-63, Marcel Dekker Inc, 1987). Métodos alternativos incluyen el uso de fagotecas o ratones transgénicos que utilizan repertorios de regiones variables humanas (Winter G; (1994) Annu Rev Immunol 12:433-455, Green LL, (1999) J Immunol Methods 231:11-23).

Ahora están disponibles varias cepas de ratones transgénicos en las que sus loci de inmunoglobulina de ratón han sido reemplazados por segmentos de genes de inmunoglobulina humana (Tomizuka K, (2000) Proc Natl Acad Sci , 97:722-727; Fishwild DM (1996) Nature Biotechnol 14:845-851; Mendez MJ, (1997) Nature Genetics 15:146-156). Tras el enfrentamiento al antígeno, dichos ratones son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos a partir del cual se pueden seleccionar anticuerpos de interés. De particular interés es el sistema TrimerTM (Eren R et al, (1988) Immunology 93:154-161), en el que linfocitos humanos son trasplantados en ratones irradiados, el Sistema de anticuerpos aislados de Linfocitos Seleccionados (SLAM, Babcook *et al*, Proc Natl Acad Sci (1996) 93:7843-7848), en que los linfocitos humanos (u otras especies) se someten efectivamente a un procedimiento de generación masiva de anticuerpos aislados *in vitro* agrupados, seguido de un procedimiento de dilución y selección desconvolucionado y limitante y el XenomouseTM (Abgenix Inc). Un enfoque alternativo está disponible de Morphotek Inc utilizando la tecnología MorphodomaTM.

La tecnología de visualización de fagos puede utilizarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de los mismos (McCafferty; (1990) Nature, 348:552-553 y Griffiths AD et al (1994) EMBO 13:3245-3260). De acuerdo con esta técnica, los genes de dominio variable de anticuerpos aislados se clonan en el marco en una capa de gen de proteína principal o secundaria de un bacteriófago filamentoso tal como M13 o fd y se muestran (habitualmente con la ayuda de un fago auxiliar) como fragmentos de anticuerpos aislados de función en la superficie de la partícula de fago. Las selecciones basadas en las propiedades de función del anticuerpo aislado dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo aislado que exhibe estas propiedades. La técnica de visualización de fagos se puede utilizar para seleccionar anticuerpos específicos para antígeno de colecciones hechas de células B humanas tomadas de individuos afectados con una enfermedad o trastorno o, alternativamente, de donantes humanos no inmunizados (Marks; J Mol Bio (1991) 222:581-591,). En los casos en los que se desea un anticuerpo aislado humano intacto que comprenda un dominio Fc, es necesario volver a clonar el fragmento derivado presentado en fago en un vector de expresión de mamífero que comprende las regiones constantes deseadas y establecer líneas celulares de expresión estables.

La técnica de maduración por afinidad (Marks; Biotechnol (1992) 10:779-783) puede utilizarse para proporcionar afinidad de unión en la que la afinidad del anticuerpo humano primario aislado se mejora reemplazando secuencialmente las regiones variables de la cadena H y L con variantes que se producen de forma natural. y seleccionando en base a afinidades de unión mejoradas. Ahora también están disponibles variantes de esta técnica, como la 'impresión de epítomos' (documento WO 93/06213; Waterhouse; Nucl Acids Res (1993) 21:2265-2266).

Diversos elementos (enumerados) de la divulgación se describen en esta memoria. Se reconocerá que las características especificadas en cada uno de los elementos puede combinarse con otras características especificadas para proporcionar elementos adicionales de la presente divulgación.

Punto 1: La molécula de unión que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), en donde la molécula de unión es un anticuerpo humano aislado o un fragmento del mismo; preferiblemente, un anticuerpo monoclonal humano aislado o un fragmento del mismo.

Punto 2: El anticuerpo humano aislado o un fragmento del mismo de acuerdo con el punto 1, en donde el anticuerpo humano aislado o un fragmento del mismo se une con un epítipo IL-18 en IL-18 tal como se define con referencia a SEQ ID NO: 1, en donde el epítipo:

a. está comprendido dentro de los siguientes aminoácidos de IL-18 tal como se define con referencia a SEQ ID NO: 1:

aminoácidos 41 y 42 y aminoácidos 87 a 97; o

ii. aminoácidos 138 a 160; o

iii. aminoácidos 177 a 181; o

iv. aminoácidos 41 y 42, aminoácidos 87 a 97, aminoácidos 138 a 160 y aminoácidos 177 a 181; o

v. aminoácidos 41, 42, 87; 89; 90; o

vi. aminoácidos 93, 94; 95, 96; o

vii. aminoácidos 140; 141; 150; 177; o

viii. aminoácidos 92; 93; 94; 138; 140; 152; 157; o

ix. aminoácidos 142; 143; 150; 152; o

x. aminoácidos 143, 144, 145; 177; 180; o

xi. aminoácidos 41, 42, 87; 89; 90; 93, 94; 95, 96; 140; 141; 150; 177; o

xii. aminoácidos 92; 93; 94; 138; 140; 142; 143; 144; 145; 150; 152; 157; 177; 180; o

xiii. aminoácidos 41; 42, 87; 89; 90; 92; 93, 94; 95, 96; 138; 140; 141; 142; 143; 144; 145; 150; 152; 157; 177; 180; o

b. comprende al menos uno, dos, tres, cuatro de los aminoácidos como se define en uno cualquiera de los grupos (i) a (xiii) enumerados en a); o

c. comprende los aminoácidos como se define en uno cualquiera de los grupos (iv) a (xii) enumerados en a).

Punto 3: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 1, que se une a un epítipo de IL-18 en IL-18 tal como se define con referencia a SEQ ID NO: 1, en donde el epítipo comprende los aminoácidos Arg140 y Glu152.

Punto 4: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 3, en donde el epítipo comprende, además, uno cualquiera o más de los aminoácidos Gln92, Pro93, Gly95, Pro143, Glu157 o Glu177.

Punto 5: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con los puntos 3 y 4, en donde el epítipo comprende, además, uno cualquiera o más de los aminoácidos Lys89, Arg94, Met96, Phe138, Ser141, Gly144, His145, Asp146, Gln150 o Leu180.

Punto 6: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos precedentes, en donde IL-18 comprende desde el aminoácido 37 al aminoácido 193 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

5 Punto 7: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos precedentes, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo inhibe la producción de interferón gamma (INF- γ) dependiente de IL-18.

10 Punto 8: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos precedentes, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 con una KD de 100 pM o menos.

15 Punto 9: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos precedentes, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo compite, además, con el anticuerpo murino 125-2H por unirse a IL-18.

20 Punto 10: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos precedentes, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 3 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 5 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 6 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 7 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 8 o variantes conservadoras de la misma.

30 Punto 11: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 10, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 3 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 4 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 5 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 6 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 7 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 8 o variantes conservadoras de la misma.

40 Punto 12: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 11, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 3 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 4 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 5 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 6 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 7 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 8 o variantes conservadoras de la misma y en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo compite con el anticuerpo murino 125-2H para unirse a IL-18.

50 Punto 13: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 10, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 3 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 9 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 5 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 6 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 7 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 8 o variantes conservadoras de la misma.

60 Punto 14: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 13, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 3 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 9 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 5 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 6 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 7 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO:

8 o variantes conservadoras de la misma y en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo compite con el anticuerpo murino 125-2H para unirse a IL-18.

Punto 15: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con los puntos 13 o 14, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y ese anticuerpo o fragmento del mismo se une a un epítipo que comprende Arg140 y Glu152 en IL-18 tal como se define con referencia a SEQ ID NO: 1, en donde el anticuerpo aislado o fragmento del mismo comprende:

una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 3 o variantes conservadoras de la misma y

ii. una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 9 o variantes conservadoras de la misma y

iii. una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 5 o variantes conservadoras de la misma y

iv. una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 6 o variantes conservadoras de la misma y

v. una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 7 o variantes conservadoras de la misma y

vi. una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 8 o variantes conservadoras de la misma.

Preferiblemente, este anticuerpo humano aislado es un anticuerpo completamente humano aislado o un fragmento del mismo, más preferiblemente un anticuerpo monoclonal completamente humano aislado o un fragmento del mismo.

Punto 16: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 10, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 3 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 10 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 5 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 6 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 7 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 8 o variantes conservadoras de la misma.

Punto 17: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 10, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 3 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 11 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 5 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 6 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 7 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 8 o variantes conservadoras de la misma.

Punto 18: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 10, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 3 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 12 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 5 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 6 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 7 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 8 o variantes conservadoras de la misma.

Punto 19: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 10, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 3 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 13 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 5 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO:

6 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 7 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 8 o variantes conservadoras de la misma.

5 Punto 20: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 19, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 3 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 13 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 10 5 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 6 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 7 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 8 o variantes conservadoras de la misma y en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo compete con el anticuerpo murino 125-2H para unirse a IL-18.

15 Punto 21: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con los puntos 19 o 20, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y ese anticuerpo o fragmento del mismo se une a un epítipo que comprende Arg140 y Glu152 en IL-18 tal como se define con referencia a SEQ ID NO: 1, en donde el anticuerpo aislado o fragmento del mismo comprende:

una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 3 o variantes conservadoras de la misma y

25 ii. una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 13 o variantes conservadoras de la misma y

iii. una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 5 o variantes conservadoras de la misma y

30 iv. una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 6 o variantes conservadoras de la misma y

v. una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 7 o variantes conservadoras de la misma y

35 vi. una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 8 o variantes conservadoras de la misma.

40 Preferiblemente, este anticuerpo humano aislado es un anticuerpo completamente humano aislado o un fragmento del mismo, más preferiblemente un anticuerpo monoclonal completamente humano aislado o un fragmento del mismo.

Punto 22: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 74 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 75 o SEQ ID NO: 76 o SEQ ID NO: 77 o SEQ ID NO: 78 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 79 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 80 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 81 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 82 o variantes conservadoras de la misma.

55 Punto 23: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 22, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 74 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 75 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 79 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 80 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 81 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 82 o variantes conservadoras de la misma.

65 Punto 24: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 22, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 74 o variantes

comprende SEQ ID NO: 123 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 124 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 125 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 127 o SEQ ID NO: 128 o SEQ ID NO: 129 o variantes conservadoras de la misma.

Punto 31: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 30, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 120 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 121 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 123 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 124 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 125 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 127 o variantes conservadoras de la misma.

Punto 32: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 30, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 120 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 121 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 123 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 124 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 125 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 128 o variantes conservadoras de la misma.

Punto 33: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 30, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 120 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 121 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 123 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 124 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 125 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 129 o variantes conservadoras de la misma.

Las regiones CDR arriba esbozadas se delinean utilizando el sistema Kabat (Kabat, E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N° 91-3242).

En algunos otros puntos de la divulgación, el anticuerpo humano o fragmento del mismo comprende las regiones CDR delineadas utilizando la definición de Chothia (Chothia et al., (1987) J Mol Biol 196: 901-17).

Punto 34: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 65 o SEQ ID NO: 66 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 60 o SEQ ID NO: 67 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 61 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 62 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 63 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 64 o variantes conservadoras de la misma.

Punto 35: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 34, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 59 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 60 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 61 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 62 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 63 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 64 o variantes conservadoras de la misma.

Punto 36: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 35, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo compite, además, con el anticuerpo murino 125-2H por unirse a IL-18.

Punto 37: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 34, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 65 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 60 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 61 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 62 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 63 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 64 o variantes conservadoras de la misma.

Punto 38: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 37, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo compite, además, con el anticuerpo murino 125-2H por unirse a IL-18.

Punto 39: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 34, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 66 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 67 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 61 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 62 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 63 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 64 o variantes conservadoras de la misma.

Punto 40: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 39, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo compite, además, con el anticuerpo murino 125-2H por unirse a IL-18.

Punto 41: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 34, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 68 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 69 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 70 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 71 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 72 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 73 o variantes conservadoras de la misma.

Punto 42: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una región variable de cadena pesada H-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 162 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 163 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena pesada H-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 164 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR1 que comprende SEQ ID NO: 165 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR2 que comprende SEQ ID NO: 166 o variantes conservadoras de la misma y una región variable de cadena ligera L-CDR3 que comprende SEQ ID NO: 167 o variantes conservadoras de la misma.

Según la definición de Kabat, tal como se comentó anteriormente, los residuos de aminoácidos de CDR en el dominio variable de la cadena pesada (VH) están numerados 31-35 (H-CDR1), 50-65 (H-CDR2) y 95-102 (H-CDR3) y los residuos de aminoácidos de CDR en el dominio variable (VL) de la cadena ligera están numerados 24-34 (L-CDR1), 50-56 (L-CDR2) y 89-97 (L-CDR3). Bajo Chothia, los aminoácidos CDR en el VH están numerados 26-32 (H-CDR1), 52-56 (H-CDR2) y 95-102 (H-CDR3); y los residuos de aminoácidos en VL están numerados 26-32 (L-CDR1), 50-52 (L-CDR2) y 91-96 (L-CDR3). Al combinar las definiciones de CDR de Kabat y Chothia y teniendo en cuenta la inserción para bucles más largos, las CDRs consisten en los residuos de aminoácidos 26-35 (H-CDR1), 50-65 (H-CDR2) y 95-102 (H-CDR3) en VH humano y residuos de aminoácidos 24-34 (L-CDR1), 50-56 (L-CDR2) y 89-97 (L-CDR3) en VL humano.

Punto 43: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una región variable (VH) de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 14 o variantes conservadoras de la misma y una región variable (VL) de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 16 o variantes conservadoras de la misma y en donde la región variable (VH) de cadena pesada comprende:

una región variable de cadena pesada H-CDR1 correspondiente a los aminoácidos 26 a 35 SEQ ID NO: 14; y

ii. una región variable de cadena pesada H-CDR2 correspondiente a los aminoácidos 50 a 66 SEQ ID NO: 14; y

iii. una región variable de cadena pesada H-CDR3 correspondiente a los aminoácidos 99 a 108 SEQ ID NO: 14;

y en donde la región variable de cadena ligera (VL) comprende:

iv. una región variable de cadena ligera L-CDR1 correspondiente a los aminoácidos 23 a 35 SEQ ID NO: 16; y

v. una región variable de cadena ligera L-CDR2 correspondiente a los aminoácidos 51 a 57 SEQ ID NO: 16; y

vi. una región variable de cadena ligera L-CDR3 correspondiente a los aminoácidos 90 a 100 SEQ ID NO: 16.

Punto 44: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 43, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo compite con el anticuerpo murino 125-2H para unirse a IL-18.

Punto 45: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con los puntos 43 o 44, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y ese anticuerpo o fragmento del mismo se une a un epítipo que comprende Arg140 y Glu152 en IL-18 tal como se define con referencia a SEQ ID NO: 1, opcionalmente el epítipo comprende, además, uno o más de los aminoácidos Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 o Leu180, preferiblemente el epítipo comprende, además, los aminoácidos Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 y Leu180.

Punto 46: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una región variable (VH) de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 18 o variantes conservadoras de la misma y una región variable (VL) de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 20 o variantes conservadoras de la misma y en donde la región variable (VH) de cadena pesada comprende:

una región variable de cadena pesada H-CDR1 correspondiente a los aminoácidos 26 a 35 SEQ ID NO: 18; y

ii. una región variable de cadena pesada H-CDR2 correspondiente a los aminoácidos 50 a 66 SEQ ID NO: 18; y

iii. una región variable de cadena pesada H-CDR3 correspondiente a los aminoácidos 99 a 108 SEQ ID NO: 18;

y en donde la región variable de cadena ligera (VL) comprende:

iv. una región variable de cadena ligera L-CDR1 correspondiente a los aminoácidos 23 a 35 SEQ ID NO: 20; y

v. una región variable de cadena ligera L-CDR2 correspondiente a los aminoácidos 51 a 57 SEQ ID NO: 20; y

vi. una región variable de cadena ligera L-CDR3 correspondiente a los aminoácidos 90 a 100 SEQ ID NO: 20.

Punto 47: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 46, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo compite con el anticuerpo murino 125-2H para unirse a IL-18.

Punto 48: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con los puntos 46 o 47, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y ese anticuerpo o fragmento del mismo se une a un epítipo que comprende Arg140 y Glu152 en IL-18 tal como se define con referencia a SEQ ID NO: 1.

Dado que cada uno de estos anticuerpos humanos puede unirse a IL18 y que la especificidad de unión al antígeno es proporcionada principalmente por las regiones CDR1, 2 y 3, las secuencias H-CDR1, 2 y 3 y las secuencias L-CDR1, 2 y 3 pueden ser "mezcladas y emparejadas" (es decir, las CDR de diferentes anticuerpos humanos se pueden mezclar y emparejar, cada uno de los anticuerpos que contienen un conjunto H-CDR1, 2 y 3 y un conjunto L-CDR1, 2 y 3 crean otras moléculas de unión anti-IL18 de la divulgación. La unión a IL18 de anticuerpos "mezclados y emparejados" de este tipo se puede testar utilizando los ensayos de unión en los Ejemplos (p. ej., ELISA). Cuando las secuencias de VH CDR se mezclan y emparejan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de VH particular debería

ser reemplazada por una secuencia o secuencias de CDR estructuralmente similares. De mismo modo, cuando las secuencias de VL CDR se mezclan y emparejan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de VL particular debería ser reemplazada por una secuencia o secuencias de CDR estructuralmente similares. Resultará evidente para el experto ordinario en la materia que las nuevas secuencias de VH y VL se pueden crear sustituyendo una o más secuencias de la región VH y/o VL CDR con secuencias estructuralmente similares de las secuencias de CDR mostradas en esta memoria para anticuerpos humanos de la presente divulgación (Figuras 1 y 2).

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo humano aislado que se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y que comprende secuencias de aminoácidos VH seleccionadas de las secuencias mostradas en SEQ ID NO : 14, 18, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 83, 87, 90, 93, 112, 130 y 138 secuencias de aminoácidos VL seleccionadas de las secuencias mostradas en SEQ ID NO 16, 20, 85, 114, 132, 140, 147 y 153. Otros anticuerpos de la divulgación incluyen aminoácidos que han sido mutados por delección, inserción o sustitución de aminoácidos, pero que tienen al menos 60, 70, 80, 90 o 95 por ciento de identidad en las regiones CDR con las regiones CDR representadas en las secuencias arriba descritas. En algunos puntos, incluye secuencias de aminoácidos mutantes en donde no se han mutado más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos por delección, inserción o sustitución de aminoácidos en las regiones CDR en comparación con las regiones CDR representadas en las secuencias arriba descritas.

Punto 49: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 28 o variantes conservadoras de la misma y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 16 o variantes conservadoras de la misma.

Punto 50: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el puntos 49, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 28 o variantes conservadoras de la misma y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 16 o variantes conservadoras de la misma, en donde el aminoácido asparagina (Asn; N) en la posición 30 con referencia a SEQ ID NO: 28 está reemplazado por un aminoácido seleccionado de lisina (Lys; K) o serina (Ser; S) o treonina (Thr; T) o alanina (Ala; A) o glutamato (Glu; E) o histidina (His; H) o leucina (Leu; L) o glutamina (Gln; Q) o arginina (Arg; R) o valina (Val; V) o tirosina (Tyr; Y) o isoleucina (Ile; I) o glicina (Gly; G).

Punto 51: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con los puntos 49 o 50, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo compite con el anticuerpo murino 125-2H para unirse a IL-18.

Punto 52: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 49 a 51, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y ese anticuerpo o fragmento del mismo se une a un epítipo que comprende Arg140 y Glu152 en IL-18 tal como se define con referencia a SEQ ID NO: 1, opcionalmente el epítipo comprende, además, uno o más de los aminoácidos Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 o Leu180, preferiblemente el epítipo comprende, además, los aminoácidos Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 y Leu180.

Punto 53: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 14 o variantes conservadoras de la misma y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 16 o variantes conservadoras de la misma.

Punto 54: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 53, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo compite con el anticuerpo murino 125-2H para unirse a IL-18.

Punto 55: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 53 a 55, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y ese anticuerpo o fragmento del mismo se une a un epítipo que comprende Arg140 y Glu152 en IL-18 tal como se define con referencia a SEQ ID NO: 1, opcionalmente el epítipo comprende, además, uno o más de los aminoácidos Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144,

Glu157, Glu177 o Leu180, preferiblemente el epítipo comprende, además, los aminoácidos Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 y Leu180.

Punto 56: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 53, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 14 o variantes conservadoras de la misma y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 16 o variantes conservadoras de la misma, en donde el aminoácido lisina (Lys; K) en la posición 30 con referencia a SEQ ID NO: 14 está reemplazado por un aminoácido seleccionado de asparagina (Asn; N) o serina (Ser; S) o treonina (Thr; T) o alanina (Ala; A) o glutamato (Glu; E) o histidina (His; H) o leucina (Leu; L) o glutamina (Gln; Q) o arginina (Arg; R) o valina (Val; V) o tirosina (Tyr; Y) o isoleucina (Ile; I) o glicina (Gly; G).

Punto 57: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 56, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo compite con el anticuerpo murino 125-2H para unirse a IL-18.

Punto 58: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 55 o 57, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y ese anticuerpo o fragmento del mismo se une a un epítipo que comprende Arg140 y Glu152 en IL-18 tal como se define con referencia a SEQ ID NO: 1, opcionalmente el epítipo comprende, además, uno o más de los aminoácidos Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 o Leu180, preferiblemente el epítipo comprende, además, los aminoácidos Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 y Leu180.

Punto 59: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 18 o variantes conservadoras de la misma y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 20 o variantes conservadoras de la misma.

Punto 60: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 59, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo compite con el anticuerpo murino 125-2H para unirse a IL-18.

Punto 61: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 59 o 60, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y ese anticuerpo o fragmento del mismo se une a un epítipo que comprende Arg140 y Glu152 en IL-18 tal como se define con referencia a SEQ ID NO: 1, opcionalmente el epítipo comprende, además, uno o más de los aminoácidos Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 o Leu180, preferiblemente el epítipo comprende, además, los aminoácidos Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 y Leu180.

Punto 62: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 40 o variantes conservadoras de la misma y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 20 o variantes conservadoras de la misma.

Punto 63: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 62, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 40 o variantes conservadoras de la misma y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 20 o variantes conservadoras de la misma, en donde

el aminoácido glutamato (Glu; E) en la posición 1 con referencia a SEQ ID NO: 40 está reemplazado por el aminoácido glutamina (Gln; Q) y

ii. en donde el aminoácido asparagina (Asn; N) en la posición 30 con referencia a SEQ ID NO: 40 está reemplazado por un aminoácido seleccionado de serina (Ser; S) o treonina (Thr; T) o aspartato (Asp; D).

Punto 64: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el puntos 63, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 40 o variantes conservadoras de la misma y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 20 o variantes conservadoras de la misma, en donde

el aminoácido glutamato (Glu; E) en la posición 1 con referencia a SEQ ID NO: 40 está reemplazado por el aminoácido glutamina (Gln; Q); y

ii. en donde el aminoácido asparagina (Asn; N) en la posición 30 con referencia a SEQ ID NO: 40 está reemplazado por un aminoácido seleccionado de serina (Ser; S) o treonina (Thr; T) o aspartato (Asp; D); y

iii. en donde el aminoácido metionina (Met; M) en la posición 54 con referencia a SEQ ID NO: 40 está reemplazado por un aminoácido seleccionado de tirosina (Tyr; Y) o asparagina (Asn; N) o isoleucina (Ile; I).

Punto 65: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con los puntos 62 a 64, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo compite con el anticuerpo murino 125-2H para unirse a IL-18.

Punto 66: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 65 a 66, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y ese anticuerpo o fragmento del mismo se une a un epítipo que comprende Arg140 y Glu152 en IL-18 tal como se define con referencia a SEQ ID NO: 1, opcionalmente el epítipo comprende, además, uno o más de los aminoácidos Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 o Leu180, preferiblemente el epítipo comprende, además, los aminoácidos Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 y Leu180.

Punto 67: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el puntos 62, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 40 o variantes conservadoras de la misma y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 20 o variantes conservadoras de la misma, en donde

el aminoácido glutamato (Glu; E) en la posición 1 con referencia a SEQ ID NO: 40 está reemplazado por el aminoácido glutamina (Gln; Q) y

ii. en donde el aminoácido serina (Ser; S) en la posición 31 con referencia a SEQ ID NO: 40 está reemplazado por un aminoácido seleccionado de treonina (Thr; T) o asparagina (Asn; N) o alanina (Ala; A).

Punto 68: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el puntos 67, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 40 o variantes conservadoras de la misma y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 20 o variantes conservadoras de la misma, en donde

el aminoácido glutamato (Glu; E) en la posición 1 con referencia a SEQ ID NO: 40 está reemplazado por el aminoácido glutamina (Gln; Q); y

ii. en donde el aminoácido serina (Ser; S) en la posición 31 con referencia a SEQ ID NO: 40 está reemplazado por un aminoácido seleccionado de treonina (Thr; T) o asparagina (Asn; N) o alanina (Ala; A).

iii. en donde el aminoácido metionina (Met; M) en la posición 54 con referencia a SEQ ID NO: 40 está reemplazado por un aminoácido seleccionado de tirosina (Tyr; Y) o asparagina (Asn; N) o isoleucina (Ile; I).

Punto 69: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con los puntos 67 o 68, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo compite con el anticuerpo murino 125-2H para unirse a IL-18.

Punto 70: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 67 a 69, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y ese anticuerpo o fragmento del mismo se une a un epítipo que comprende Arg140 y

Glu152 en IL-18 tal como se define con referencia a SEQ ID NO: 1, opcionalmente el epítipo comprende, además, uno o más de los aminoácidos Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 o Leu180, preferiblemente el epítipo comprende, además, los aminoácidos Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 y Leu180.

Punto 72: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 25 o SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 34 o variantes conservadoras de la misma y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 16 o variantes conservadoras de la misma.

Punto 73: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 37 y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 20 o variantes conservadoras de la misma.

Punto 74: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) seleccionada de las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 43, 47, 50, 53, 56, 96, 100, 103, 116, 134, 142 y 158 o variantes conservadoras de las mismas y una secuencia de aminoácidos VL seleccionadas de las secuencias mostradas en SEQ ID NO 45, 98, 118, 136, 144, 150, 156 y 160 o variantes conservadoras de las mismas.

Punto 75: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de VH seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 43 o variantes conservadoras de la misma y una secuencia de aminoácidos de VL seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 45 o variantes conservadoras de la misma.

Punto 76: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 75, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo compite con el anticuerpo murino 125-2H para unirse a IL-18.

Punto 77: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 75 o 76, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y ese anticuerpo o fragmento del mismo se une a un epítipo que comprende Arg140 y Glu152 en IL-18 tal como se define con referencia a SEQ ID NO: 1, opcionalmente el epítipo comprende, además, uno o más de los aminoácidos Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 o Leu180, preferiblemente el epítipo comprende, además, los aminoácidos Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 y Leu180.

Punto 78: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de VH seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 158 o variantes conservadoras de la misma y una secuencia de aminoácidos de VL seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 160 o variantes conservadoras de la misma.

Punto 79: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con el punto 78, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo compite con el anticuerpo murino 125-2H para unirse a IL-18.

Punto 80: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 78 o 79, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y ese anticuerpo o fragmento del mismo se une a un epítipo que comprende Arg140 y Glu152 en IL-18 tal como se define con referencia a SEQ ID NO: 1, opcionalmente el epítipo comprende, además, uno o más de los aminoácidos Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 o Leu180, preferiblemente el epítipo comprende, además, los aminoácidos Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 y Leu180.

Punto 81: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de

unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una secuencia de aminoácidos de VH seleccionada de las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 50 o SEQ ID NO: 56 o variantes conservadoras de la misma y una secuencia de aminoácidos de VL seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 45 o variantes conservadoras de la misma.

Punto 82: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una secuencia de aminoácidos de VH seleccionada de las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 100 o variantes conservadoras de la misma y una secuencia de aminoácidos de VL seleccionada de las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 160 o variantes conservadoras de la misma.

Punto 83: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con los puntos 81 o 82, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo compite con el anticuerpo murino 125-2H para unirse a IL-18.

Punto 84: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 81 a 83, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y ese anticuerpo o fragmento del mismo se une a un epítipo que comprende Arg140 y Glu152 en IL-18 tal como se define con referencia a SEQ ID NO: 1, opcionalmente el epítipo comprende, además, uno o más de los aminoácidos Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 o Leu180, preferiblemente el epítipo comprende, además, los aminoácidos Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 y Leu180.

Punto 85: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una secuencia de aminoácidos de VH seleccionada de las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 96 o SEQ ID NO: 103 o variantes conservadoras de la misma y una secuencia de aminoácidos de VL seleccionada de las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 98 o variantes conservadoras de la misma.

Punto 86: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de VH seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 116 o variantes conservadoras de la misma y una secuencia de aminoácidos de VL seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 118 o variantes conservadoras de la misma.

Punto 87: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de VH seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 142 o variantes conservadoras de la misma y una secuencia de aminoácidos de VL seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 144 o variantes conservadoras de la misma.

Punto 88: El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en donde el anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de VH seleccionada de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 134 o variantes conservadoras de la misma y una secuencia de aminoácidos de VL seleccionada de las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 136 o SEQ ID NO: 150 o SEQ ID NO: 156 o variantes conservadoras de la misma.

2.2) Anticuerpos humanizados o quiméricos

Una alternativa obvia a la invención descrita en esta memoria es el uso de anticuerpos humanizados o quiméricos en lugar de anticuerpos humanos.

El uso de anticuerpos no humanos intactos en el tratamiento de enfermedades o trastornos humanos conlleva el potencial de los problemas de inmunogenicidad ahora bien establecidos. Es decir, el sistema inmune del paciente puede reconocer el anticuerpo aislado intacto no humano como no propio y montar una respuesta de anticuerpo. Esto es particularmente evidente tras la administración múltiple del anticuerpo aislado no humano a un paciente humano. Se han desarrollado varias técnicas a lo largo de los años para superar estos problemas y generalmente implican reducir la firma de inmunogenicidad no humana en el anticuerpo aislado intacto al tiempo que se conserva la relativa facilidad para obtener anticuerpos no humanos de un animal inmunizado, p. ej., ratón, rata o conejo. En términos generales, se han utilizado dos enfoques para lograr esto. El primero son anticuerpos quiméricos (a veces "quiméricos"), que generalmente comprenden un dominio variable no humano (p. ej., roedor tal como ratón) fusionado a una región constante humana. Debido a que el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo aislado se localiza dentro

de las regiones variables, el anticuerpo quimérico aislado retiene su afinidad de unión por el antígeno, pero adquiere las funciones efectoras de la región constante humana y, por lo tanto, puede realizar funciones efectoras como se describe *supra*. Los anticuerpos quiméricos se producen típicamente utilizando métodos de ADN recombinante. El ADN que codifica los anticuerpos (p. ej., ADNc) se aísla y secuencia mediante procedimientos convencionales (p. ej., utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo aislado de la divulgación. Las células de hibridoma sirven como una fuente típica de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se coloca en vectores de expresión que luego se transfectan en células huésped tales como *E. coli*, células COS, células CHO o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis del anticuerpo aislado. El ADN puede modificarse sustituyendo la secuencia codificante de las cadenas L y H humanas por las regiones constantes H y L no humanas (p. ej., murinas) (Morrison; PNAS 81, 6851 (1984)).

El segundo enfoque implica la generación de anticuerpos humanizados, en donde el contenido no humano del anticuerpo aislado se reduce humanizando las regiones variables. Dos técnicas para la humanización han ganado popularidad. La primera es la humanización por injerto CDR. Las CDR construyen bucles cerca del extremo N del anticuerpo aislado en donde forman una superficie montada en un armazón proporcionado por la región marco. La especificidad de unión al antígeno del anticuerpo aislado se define principalmente por la topografía y por las características químicas de su superficie CDR. Estas características están a su vez determinadas por la conformación de las CDR individuales, por la disposición relativa de las CDR y por la naturaleza y disposición de las cadenas laterales de los residuos que comprenden las CDR. Se puede lograr una gran disminución de la inmunogenicidad injertando solo las CDR de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) (anticuerpos 'donantes') en el marco humano ('marco aceptor') y regiones constantes (Jones *et al* (1986) Nature 321:522-525 y Verhoeven M *et al* (1988) Science 239:1534-1536). Sin embargo, el injerto de CDR per se puede no dar como resultado la retención completa de las propiedades de unión al antígeno y se encuentra con frecuencia que algunos residuos del marco (a los que a veces se alude como 'mutaciones inversas') del anticuerpo aislado del donante deben conservarse en el compuesto humanizado si se debe recuperar una afinidad de unión a antígeno significativa (Queen C *et al.*, (1989) Proc Natl Acad Sci 86:10029-10033, Co, M *et al* (1991) Nature 351, 501-502). En este caso, las regiones variables humanas que muestran la mayor homología de secuencia con el anticuerpo aislado del donante no humano se eligen de una base de datos con el fin de proporcionar el marco humano (FR). La selección de los FR humanos se puede hacer por consenso humano o por anticuerpos humanos individuales. Cuando es necesario, los residuos clave del anticuerpo aislado del donante se sustituyen en el marco aceptor humano para preservar las conformaciones de CDR. El modelado por computadora del anticuerpo aislado puede utilizarse para ayudar a identificar estos residuos estructuralmente importantes.

Alternativamente, la humanización puede lograrse mediante un proceso de 'recubrimiento'. Un análisis estadístico de regiones variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana y murina únicas reveló que los patrones precisos de los residuos expuestos son diferentes en los anticuerpos humanos y murinos, y la mayoría de las posiciones de superficie individuales tienen una fuerte preferencia por un pequeño número de residuos diferentes (Padlan EA, *et al*; (1991) Mol Immunol 28:489-498 y Pedersen JT *et al* (1994) J Mol Biol 235:959-973). Por lo tanto, es posible reducir la inmunogenicidad de un Fv no humano reemplazando los residuos expuestos en sus regiones marco que difieren de los que se encuentran habitualmente en los anticuerpos humanos. Debido a que la antigenicidad de las proteínas puede estar correlacionada con la accesibilidad de la superficie, el reemplazo de los residuos de la superficie puede ser suficiente para hacer que la región variable del ratón sea 'invisible' para el sistema inmune humano (también Mark GE *et al* (1994) en Handbook of Experimental Pharmacology vol 113: The pharmacology of monoclonal Antibodies, Springer-Verlag, págs. 105-134). Este procedimiento de humanización se conoce como 'recubrimiento', debido a que solo se altera la superficie del anticuerpo aislado, los residuos de soporte permanecen intactos.

2.3) Fragmentos de anticuerpos aislados y anticuerpos de dominio variable único

En otra realización de la invención, la molécula de unión es un fragmento de un anticuerpo que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18 / IL-18 (IL-18 BP). Preferiblemente, la molécula de unión es un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fv o un scFv.

Tradicionalmente, dichos fragmentos se producen por la digestión proteolítica de anticuerpos intactos, p. ej., por digestión con papaína (véase, por ejemplo, el documento WO 94/29348), pero pueden producirse directamente a partir de células huésped transformadas de forma recombinante. Además, se pueden producir fragmentos de anticuerpos aislados utilizando una diversidad de técnicas de ingeniería tal como se describe más adelante.

Los fragmentos Fv parecen tener una energía de interacción menor de sus dos cadenas que los fragmentos Fab. Para estabilizar la asociación de los dominios VH y VL, estos se han relacionado con péptidos (Bird *et al.*, (1988) Science, 242:423-426, Huston *et al.*, (1998) PNAS, 85:5879-5883), puentes disulfuro (Glockshuber *et al.*, (1990) Biochemistry, 29:1362-1367) y mutaciones de 'botón en ojal' (Zhu *et al* (1997), Protein Sci, 6:781-788). Los fragmentos ScFv pueden producirse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica (Whitlow *et al* (1991), Methods companion Methods Enzymol, 2:97-105 y Huston *et al* (1993) Int Rev Immunol 10:195-217). ScFv se puede producir en células bacterianas tales como *E. coli*, pero se produce más preferiblemente en células eucariotas. Una desventaja de scFv

es la monovalencia del producto, que impide una avidéz incrementada debido a la unión polivalente y su corta semivida. Intentos de superar estos problemas incluyen (scFv)₂ bivalente, producido a partir de scFv que contiene una cisteína C terminal adicional por acoplamiento químico (Adams et al (1993) Can Res 53:4026-4034 y McCartney et al (1995) Protein Eng, 8:301-314) o mediante dimerización espontánea específica para el sitio de scFv que contiene un residuo cisteína C-terminal no apareado (Kipriyanov et al (1995) Cell. Biophys 26:187-204). Alternativamente, scFv puede ser forzado a formar multímeros acortando el enlazador peptídico a 3 y 12 residuos para formar 'diacuerpos' (Holliger et al PNAS (1993), 90:6444-6448). Reducir aún más el enlazador puede resultar en trímeros scFv ('triacuerpos', véase Kortt et al (1997) Protein Eng, 10:423-433) y tetrámeros ('tetracuerpos', Le Gall et al (1999) FEBS Lett, 453:164-168). La construcción de compuestos scFv bivalentes también se puede lograr mediante fusión genética con motivos de dimerización de proteínas para formar 'minianticuerpos' (Pack et al (1992) Biochemistry 31:1579-1584) y 'minicuerpos' (Hu et al (1996), Cancer Res. 56:3055-3061). Los tándems ScFv-sc-Fv ((scFv) 2) también pueden producirse enlazando dos unidades scFv mediante un tercer enlazador peptídico (véase Kurucz et al (1995) J Immunol, 154:4576-4582). Los diacuerpos biespecíficos se pueden producir a través de la asociación no covalente de dos productos de fusión de cadena sencilla que consisten en el dominio VH de un anticuerpo aislado conectado por un enlazador corto al dominio VL de otro anticuerpo aislado, (véase Kipriyanov et al (1998), Int J Can 77:763-772). La estabilidad de tales diacuerpos biespecíficos puede potenciarse mediante la introducción de puentes disulfuro o mutaciones de 'botón en el ojal' tal como se describió anteriormente o mediante la formación de diacuerpos de cadena sencilla (ScDb), en donde dos fragmentos scFv híbridos están conectados a través de un enlazador peptídico (véase Kontermann et al (1999) J Immunol Methods 226:179-188). Compuestos biespecíficos tetravalentes están disponibles, p. ej., fusionando un fragmento scFv al dominio CH3 de un compuesto IgG o a un fragmento Fab a través de la región bisagra (véase Coloma et al (1997) Nature Biotechnol, 15:159-163). Alternativamente, los compuestos biespecíficos tetravalentes se han creado mediante la fusión de diacuerpos biespecíficos de cadena sencilla (véase Alt et al (1999) FEBS Lett 454:90-94). Compuestos biespecíficos tetravalentes más pequeños también se pueden formar mediante la dimerización de los tándems scFv-scFv con un enlazador que contiene un motivo hélice-bucle-hélice (minianticuerpos DiBi, véase Muller et al (1998) FEBS Lett 432:45-49) o un compuesto de cadena sencilla que comprende cuatro dominios variables de anticuerpos aislados (VH y VL) en una orientación que evita el apareamiento intramolecular (diacuerpo en tándem, véase Kipriyanov et al, (1999) J Mol Biol 293:41-56). Fragmentos biespecíficos F(ab')₂ se pueden crear por acoplamiento químico de fragmentos Fab' o por heterodimerización a través de cremalleras de leucina (véase Shalaby et al (1992) J Exp Med 175:217-225 y Kostelny et al (1992), J Immunol 148:1547-1553).

2.4) Anticuerpos homólogos o fragmentos de los mismos y variantes conservadoras

En otra realización de la presente divulgación, la molécula de unión es un anticuerpo o un fragmento del mismo que tiene secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera de región variable o secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera que son homólogas a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos descritos en esta memoria, y en donde los anticuerpos homólogos o fragmento de los mismos conservan las propiedades funcionales deseadas de la molécula de unión de acuerdo con la divulgación.

Por ejemplo, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que comprende un VH y un VL, en donde: el VH es al menos 80%, o al menos 90% idéntico a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs:14; 18; 22; 25; 28; 31; 34; 37; 40; 83; 87; 90; 93; 112; 130 o 138; el VL es al menos 80%, o al menos 90% idéntico a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs:16; 20; 85; 114; 132; 140; 147 o 153, en donde el anticuerpo homólogo se une específicamente a IL18 y no se une al complejo de proteína de unión IL-18/IL-18 (IL-18 BP). El anticuerpo homólogo puede exhibir al menos una propiedad funcional adicional, tal como inhibir la unión de IL18 a IL18R o inhibir la producción de IFN-γ dependiente de IL18.

En otras realizaciones de la divulgación, las secuencias de aminoácidos de VH y/o VL pueden ser 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias arriba recogidas. En otras realizaciones de la divulgación, las secuencias de aminoácidos de VH y/o VL pueden ser idénticas, excepto una sustitución de aminoácidos en no más de 1, 2, 3, 4 o 5 posiciones de aminoácidos. Un anticuerpo que tiene regiones VH y VL que tienen una identidad alta (es decir, 80% o mayor) con las regiones VH y VL de SEQ ID NOs 14; 18; 22; 25; 28; 31; 34; 37; 40; 83; 87; 90; 93; 112; 130 o 138 y SEQ ID NOs 16; 20; 85; 114; 132; 140; 147 o 153, respectivamente, pueden obtenerse por mutagénesis (p. ej., mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican SEQ ID NOs: 15; 19; 23; 26; 29; 32; 35; 38; 41; 84; 88; 91; 94; 113; 131; 139; 146 o 152 y 17; 21; 24; 27; 30; 33; 36; 39; 42; 86; 89; 92; 95; 115; 133; 141; 148 o 154, respectivamente, seguido de testar el anticuerpo alterado codificado en cuanto a la función retenida (es decir, las funciones arriba recogidas) utilizando los ensayos funcionales descritos en esta memoria.

El anticuerpo homólogo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1 silencioso completamente humano.

Tal como se utiliza en esta memoria, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = n° de posiciones idénticas/n° total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada uno de los huecos, que deben introducirse para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación

del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede realizarse usando un algoritmo matemático, tal como se describe más adelante.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller, (1988) Comput. Appl. Biosci 4:11-17 que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. Alternativamente, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) J Mol Biol 48:444-453, que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), utilizando una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

2.5) Anticuerpos de Dominio Variable Dual

Los anticuerpos de dominio variable dual (DVD) comprenden dos o más sitios de unión a antígeno y son anticuerpos tetravalentes o multivalentes tal como, por ejemplo, divalentes y tetravalentes. El anticuerpo multivalente está especialmente diseñado para tener dos o más sitios de unión a antígeno, y generalmente no es un anticuerpo que se produce de forma natural. Los anticuerpos de DVD pueden ser capaces de unir dos o más dianas relacionadas o no relacionadas. Dichos anticuerpos DVD pueden ser monoespecíficos, es decir, son capaces de unirse a un antígeno, o multiespecíficos, es decir, son capaces de unirse a dos o más antígenos. En algunas realizaciones de la divulgación, el anticuerpo DVD comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada una de las cadenas pesadas y cada una de las cadenas ligeras comprende dos sitios de unión a antígeno. Cada uno de los sitios de unión comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera con un total de 6 CDR implicados en la unión a antígeno por sitio de unión a antígeno.

En una realización de la divulgación, la molécula de unión de la presente divulgación es un anticuerpo de dominio variable doble (DVD) que se une a IL-18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP).

Particularmente, el anticuerpo de dominio variable dual de acuerdo con la divulgación es capaz de unir IL-18 y una segunda diana. La segunda diana puede seleccionarse de IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-17, IL-25, IL-33, IL-1 β , TNF alfa/beta e IFN- γ .

2.6) Moléculas y anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos

En una realización de la divulgación, la molécula de unión de la presente divulgación es un anticuerpo biespecífico aislado o fragmento del mismo que comprende una primera especificidad para IL-18 y una segunda especificidad para otro polipéptido, p. ej., IL-12; en donde el anticuerpo biespecífico no se une al complejo de la proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP).

Particularmente, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la divulgación es capaz de unirse a IL-18 y una segunda diana. La segunda diana puede seleccionarse de IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-17, IL-25, IL-33, IL-1 β , TNF alfa/beta e IFN- γ .

En aún otro aspecto, la presente divulgación proporciona una molécula de unión que es un anticuerpo multiespecífico aislado o fragmento del mismo que comprende una primera especificidad para IL-18, una segunda especificidad para otro polipéptido, p. ej., IL-12 y al menos una tercera especificidad para otro polipéptido, en donde el anticuerpo multiespecífico no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP).

Particularmente, el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la divulgación es capaz de unirse a IL-18 y una segunda y una tercera diana. La segunda y la tercera diana puede seleccionarse de IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-17, IL-25, IL-33, IL-1 β , TNF alfa/beta e IFN- γ .

Un anticuerpo aislado biespecífico es un anticuerpo aislado que tiene especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes. Métodos para fabricar tales anticuerpos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena L-cadena H de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas H tienen especificidades de unión diferentes (véase Millstein et al, (1983) Nature 305:537-539, documento WO93/08829 y Traunecker *et al*, (1991) EMBO 10:3655-3659). Debido al surtido aleatorio de cadenas H y L, se produce una mezcla potencial de diez estructuras de anticuerpos aisladas diferentes, de las cuales solo una tiene la especificidad de unión deseada. Un enfoque alternativo implica fusionar los dominios variables con las especificidades de unión deseadas a la región constante de la cadena pesada que comprende al menos parte de la región bisagra, las regiones CH2 y CH3. Se prefiere tener la región CH1 que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. El ADN que codifica estas fusiones y, si se desea, la cadena L, se insertan en vectores de expresión separados y luego se co-transfectan en un organismo huésped adecuado. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas en un vector de expresión. En un enfoque preferido, el anticuerpo aislado biespecífico está compuesto por una cadena H con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadenas H-L, que proporciona una

segunda especificidad de unión en el otro brazo, véase el documento WO94/04690. Véase también Suresh *et al*, Methods in Enzymology 121, 210, 1986.

Los anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos de la divulgación pueden derivatizarse o enlazarse a otra molécula funcional, p. ej., otro péptido o proteína (p. ej., otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se une a al menos dos sitios de unión o moléculas diana diferentes. De hecho, un anticuerpo de la divulgación puede derivatizarse o enlazarse a más de otra molécula funcional para generar moléculas multiespecíficas que se unen a más de dos sitios de unión diferentes y/o moléculas diana; moléculas multiespecíficas de este tipo también están destinadas a estar abarcadas por la expresión "molécula biespecífica" tal como se utiliza en esta memoria. Para crear una molécula biespecífica de la divulgación, un anticuerpo de la divulgación se puede enlazar funcionalmente (p. ej., mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente u otro) a una o más de otras moléculas de unión, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de unión, de modo que resulte una molécula biespecífica.

En una realización de la divulgación, las moléculas biespecíficas de la divulgación comprenden como una especificidad de unión al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo de las mismas, que incluye, p. ej., un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o un Fv de cadena sencilla. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena ligera o cadena pesada, o cualquiera de sus fragmentos mínimos tales como un Fv o un constructo monocatenario tal como se describe en la Patente de EE.UU. N.º 4946778 de Ladner *et al*.

Otros anticuerpos que se pueden emplear en las moléculas biespecíficas de la divulgación son anticuerpos monoclonales de murino, quiméricos y humanizados.

Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la presente divulgación se pueden preparar conjugando las especificidades de unión del constituyente, utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica puede generarse por separado y después conjugarse entre ellas. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, se pueden utilizar diversidad de agentes de acoplamiento o reticulación para la conjugación covalente. Ejemplos de agentes de reticulación incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) y ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometilo) (sulfo-SMCC) (véase, p. ej. Karpovsky *et al* (1984) J Exp Med; 160:1686; Liu, MA *et al* (1985) Proc Natl Acad Sci USA; 82:8648). Otros métodos incluyen los descritos en Paulus (1985) Behring Inst Mitt ; 78:118-132; Brennan *et al* (1985) Science ; 229:81-83), y Glennie *et al* (1987) J Immunol; 139:2367-2375. Los agentes de conjugación son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles en Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, pueden conjugarse mediante enlaces sulfhidrilo de las regiones de bisagra C-terminal de las dos cadenas pesadas. En una realización particular de la divulgación, la región de bisagra se modifica para contener un número impar de residuos sulfhidrilo, por ejemplo uno, antes de la conjugación.

Como alternativa, ambas especificidades de unión se pueden codificar en el mismo vector, y expresarse y ensamblarse en la misma célula hospedadora. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es una proteína de fusión mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ o ligando x Fab. Una molécula biespecífica de la divulgación puede ser una molécula monocatenaria que comprenda un anticuerpo monocatenario y un determinante de unión, o una molécula biespecífica monocatenaria que comprenda dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas monocatenarias. Métodos para preparar moléculas biespecíficas se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. Número 5.260.203; Patente de EE.UU. Número 5.455.030; Patente de EE.UU. Número 4.881.175; Patente de EE.UU. Número 5.132.405; Patente de EE.UU. Número 5.091.513; Patente de EE.UU. Número 5.476.786; Patente de EE.UU. Número 5.013.653; Patente de EE.UU. Número 5.258.498; y Patente de EE.UU. Número 5.482.858.

La unión de las moléculas biespecíficas a sus dianas específicas puede confirmarse, por ejemplo, mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), análisis FACS, bioensayo (p. e., Inhibición del crecimiento) o ensayo de transferencia Western. Cada uno de estos ensayos en general detecta la presencia de complejos de proteína-anticuerpo de particular interés empleando un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés.

2.7) Anticuerpos multivalentes

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona anticuerpos multivalentes que comprenden al menos dos porciones de unión a antígeno idénticas o diferentes de los anticuerpos de la divulgación que se unen a IL-18 y que no se unen al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP).

En una realización de la divulgación, el anticuerpo multivalente proporciona al menos dos, tres o cuatro porciones de unión a antígeno de los anticuerpos descritos en esta memoria. Las porciones de unión a antígeno pueden enlazarse entre sí mediante fusión de proteínas o enlace covalente o no covalente. Como alternativa, se han descrito métodos de enlace para las moléculas biespecíficas. Pueden obtenerse compuestos tetravalentes, por ejemplo, reticulando

anticuerpos de la divulgación con un anticuerpo que se une a las regiones constantes de los anticuerpos de la divulgación, por ejemplo, la región Fc o de bisagra.

2.8) Inmunoconjugados

En otra realización de la divulgación, la molécula de unión es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a IL-18 pero que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), en donde el anticuerpo o fragmento del mismo se conjuga con un resto terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (p. ej., un inmunosupresor) o una radiotoxina.

A conjugados de este tipo se les alude en esta memoria como "inmunoconjugados". A los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se les alude como "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para (p. ej., destruya) las células. Ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, t. colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina y análogos u homólogos de los mismos. Agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (p. ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes de ablación (p. ej., mecloretamina, tiotepa-clorambucilo, meifalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino, antraciclinas (p. ej., daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p. ej., dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC)) y agentes antimetabólicos (p. ej., vincristina y vinblastina).

Otros ejemplos de citotoxinas terapéuticas que pueden conjugarse a un anticuerpo de la divulgación incluyen duocarmicinas, calicheamicinas, maitansinas y auristatinas, y derivados de las mismas. Un ejemplo de un conjugado de anticuerpo con calicheamicina está disponible en el mercado (MylotargTM; Wyeth-Ayerst).

Las citotoxinas se pueden conjugar con anticuerpos de la divulgación utilizando la tecnología de enlazador disponible en la técnica. Ejemplos de tipos de enlazador que se han utilizado para conjugar una citotoxina a un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y enlazadores que contienen péptidos. Se puede elegir un conector que sea, por ejemplo, susceptible de escisión por pH bajo dentro del compartimiento lisosómico o susceptible de escisión por proteasas, tales como proteasas expresadas preferentemente en tejido tumoral tal como cathepsinas (por ejemplo, cathepsinas B, C, D).

Para una discusión más detallada sobre los tipos de citotoxinas, enlazadores y métodos para conjugar agentes terapéuticos con anticuerpos, véase también Saito, G *et al* (2003) *Adv Drug Deliv Rev*; 55:199-215; Trail, PA *et al* (2003) *Cancer Immunol Immunother*; 52:328-337; Payne, G (2003) *Cancer Cell*; 3:207-212; Allen, TM (2002) *NatRev Cancer*; 2:750-763; Pastan, I and Kreitman, R J (2002) *Curr Opin Investig Drugs*; 3:1089-1091; Senter, PD y Springer, CJ (2001) *Adv Drug Deliv Rev*; 53:247-264.

Los anticuerpos de la presente divulgación también pueden conjugarse con un isótopo radiactivo para generar radiofármacos citotóxicos, también denominados radioinmunoconjugados. Ejemplos de isótopos radiactivos que se pueden conjugar con anticuerpos para su uso diagnóstico o terapéutico incluyen, pero no se limitan a, yodo131, indio111, itrio90 y lutecio177. Métodos para preparar radioinmunoconjugados se establecen en la técnica. Están disponibles comercialmente ejemplos de radioinmunoconjugados que incluyen ZevalinTM (DEC Pharmaceuticals) y BexxarTM (Corixa Pharmaceuticals), y se pueden usar métodos similares para preparar radioinmunoconjugados utilizando los anticuerpos de la divulgación.

Los conjugados de anticuerpo de la divulgación pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada, y no se deduce que el resto de fármaco tenga que estar limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacéutico puede ser una proteína o polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Proteínas de este tipo pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o un fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina de la difteria; o factores de crecimiento.

Técnicas para conjugar un resto terapéutico de este tipo con anticuerpos son bien conocidas, véase, p. ej., Amon *et al* "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al* "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson *et al* (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985) y Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", (1982) *Immunol Rev*; 62:119-58.

2.9) Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados también forman una realización de la presente divulgación. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos unidos covalentemente, formados utilizando cualquier método de reticulación conveniente, en el que al menos uno de los anticuerpos unidos es un anticuerpo de acuerdo con la divulgación que se une a IL-18 pero no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP). Véase, por ejemplo, el documento US 4.676.980.

2.10) Ingeniería de marcos

Anticuerpos modificados de la divulgación incluyen aquellos en los que se han realizado modificaciones a los residuos marco dentro de VH y/o VL, p. ej., para mejorar las propiedades del anticuerpo. Normalmente, tales modificaciones del marco se realizan para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, una estrategia consiste en "retromutar" uno o más residuos del marco hasta la secuencia de la línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha experimentado una mutación somática puede contener residuos del marco que difieran de la secuencia de la línea germinal de la que deriva el anticuerpo. Tales residuos se pueden identificar comparando las secuencias del marco del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de las que deriva el anticuerpo. Para devolver las secuencias de la región flanqueante a su configuración de la línea germinal, las mutaciones somáticas pueden "retromutarse" a la secuencia de la línea germinal por, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR. También se pretende que dichos anticuerpos "retromutados" estén englobados por la divulgación.

Otro tipo de modificación en el marco implica mutar uno o más residuos dentro de la región de entramado, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar los epítomos de linfocitos T con el fin de reducir de este modo la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. A este enfoque también se le alude como "desinmunización" y se describe con más detalle en la publicación de patente de EE.UU. N° 20030153043 de Carr et al.

2.11) Otras modificaciones

Además o como alternativa a las modificaciones hechas dentro de las regiones flanqueantes o CDR, los anticuerpos de la divulgación pueden diseñarse para que incluyan modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tal como la semivida en suero, la fijación del complemento, la unión al receptor de Fc y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo de la divulgación puede modificarse químicamente (p. ej., pueden adherirse uno o más restos químicos al anticuerpo) o modificarse para alterar su glucosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones de la divulgación se describe con más detalle más adelante. La numeración de los residuos en la región Fc es la del índice EU de Kabat.

En una realización de la divulgación, la región de la bisagra de CH1 se modifica de tal manera que el número de residuos cisteína en la región de bisagra se altera, p. ej., aumenta o disminuye. Este enfoque se describe adicionalmente en la Patente de EE.UU. N° 5.677.425 de Bodmer et al. El número de residuos cisteína en la región de bisagra de CH1 se altera, por ejemplo, para facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otra realización de la divulgación, la región de bisagra Fc de un anticuerpo está mutada para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento de bisagra Fc, de modo que el anticuerpo tiene una unión deteriorada de la proteína A estafilocócica (SpA) en relación con la unión SpA del dominio de bisagra Fc nativo. Este enfoque se describe con más detalle en la Patente de EE.UU. N° 6.165.745 de Ward et al.

En otra realización de la divulgación, el anticuerpo se modifica para aumentar la semivida biológica. Son posibles diversos enfoques. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente de EE.UU. N° 6277375 de Ward. Alternativamente, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región CH1 o CL para contener un epítipo de unión al receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG tal como se describe en las patentes de EE.UU. N° 5.869.046 y 6.121.022 de Presta et al.

En aún otras realizaciones de la divulgación, la región Fc se altera al reemplazar al menos un residuo aminoácido con un residuo aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden reemplazarse por un residuo de aminoácido diferente de modo que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector pero conserve la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo original. El ligando efector al que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe con más detalle en las patentes de EE.UU. N° 5.624.821 y 5.648.260, ambas de Winter et al.

En otra realización de la divulgación, uno o más aminoácidos seleccionados de residuos de aminoácidos pueden reemplazarse por un residuo de aminoácido diferente de modo que el anticuerpo haya alterado la unión a C1q y/o

haya reducido o eliminado la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Este enfoque se describe con más detalle en la Patente de EE.UU. N° 6.194.551 de Idusogie et al.

5 En otra realización de la divulgación, se alteran uno o más residuos de aminoácidos están alterados, para con ello alterar la capacidad del anticuerpo de fijar el complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en la Publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer et al.

10 En aún otra realización de la divulgación, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar en la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcy modificando uno o más aminoácidos. Este enfoque se describe adicionalmente en la Publicación PCT WO 00/42072 de Presta. Además, los sitios de unión en IgG1 humana para FcyRI, FcyRII, FcyRIII y FcRn se han mapeado y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields, R.L. et al, (2001) J Biol Chem 276:6591-6604).

15 En determinadas realizaciones de la divulgación, se utiliza el dominio Fc del isotipo IgG1. En algunas realizaciones específicas se utiliza una variante mutante del fragmento Fc de IgG1, p. ej., una Fc IgG1 silenciosa que reduce o elimina la capacidad del polipéptido de fusión de mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para unirse a un receptor Fcy. Un ejemplo de un mutante silencioso del isotipo IgG1 en el que el residuo de Leucina se reemplaza por el residuo de Alanina en las posiciones de aminoácidos 234 y 235 como se describe por Hezareh et al, J. Virol (2001); 75(24):12161-8.

20 En determinadas realizaciones de la divulgación, el dominio Fc es una glicosilación que previene mutantes en la posición 297 del dominio Fc. Por ejemplo, el dominio Fc contiene una sustitución de aminoácidos del residuo asparagina en la posición 297. Un ejemplo de una sustitución de aminoácidos de este tipo es el remplazo de N297 por una glicina o una alanina.

25 En aún otra realización de la divulgación, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede hacer un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Modificaciones de hidratos de carbono de este tipo se pueden lograr; por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia de anticuerpos. Por ejemplo, se pueden hacer una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación en el marco de la región variable para eliminar de ese modo la glicosilación en ese sitio. Una aglicosilación de este tipo puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Un enfoque de este tipo se describe con más detalle en las patentes de EE.UU. N° 5.714.350 y 6.350.861, ambas de Co et al.

30 Adicionalmente o de forma alternativa, se puede preparar un anticuerpo que tenga un tipo alterado de glicosilación tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tenga cantidades mayores de estructuras de GlcNac entrecruzadas. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de los hidratos de carbono se pueden conseguir, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con una maquinaria de glicosilación alterada. Se han descrito en el área células con maquinaria de glicosilación alterada y se pueden usar como células huésped en las cuales expresar anticuerpos recombinantes de la divulgación para producir de ese modo un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1.176.195 de Hang et al. describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosil transferasa, de modo que los anticuerpos expresados en dicha línea celular exhiben hipofucosilación. Por lo tanto, en una realización de la divulgación, los anticuerpos se producen por expresión recombinante en una línea celular que exhibe un patrón de hipofucosilación, por ejemplo una línea celular de mamífero con expresión deficiente del gen FUT8 que codifica fucosil transferasa. La Publicación PCT WO 03/035835 de Presta describe una variante de la línea celular CHO, células Lec13, con una capacidad reducida para unir la fucosa a carbohidratos enlazados mediante Asn(297), lo cual asimismo da como resultado la hipofucosilación de los anticuerpos expresados en esa célula huésped (véase también Shields, R.L. et al., 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740). La Publicación PCT WO 99/54342 de Umana et al. describe líneas celulares modificadas para que expresen glicosil-transferasas modificadoras de glicoproteínas (p. ej., beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de modo que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas exhiben un incremento de estructuras GlcNac entrecruzadas, lo cual da como resultado una mayor actividad de ADCC de los anticuerpos (véase también Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17:176-180). Alternativamente, los anticuerpos de la divulgación pueden producirse en una levadura o un hongo filamentoso diseñado para un patrón de glicosilación similar a un mamífero, y capaz de producir anticuerpos que carecen de fucosa como patrón de glicosilación (véase, por ejemplo, el documento EP1297172B1).

60 Otra modificación de los anticuerpos en esta memoria que se contempla en la divulgación es la pegilación. Un anticuerpo puede pegilarse para, por ejemplo, aumentar la semivida biológica (p. ej., suero) del anticuerpo. Para pegar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, se hace reaccionar generalmente con polietilenglicol (PEG), como un éster reactivo o un derivado aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG se unen al anticuerpo o fragmento del anticuerpo. La pegilación se puede llevar a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula reactiva de PEG (o un polímero hidrosoluble reactivo análogo). Tal como se utiliza en esta memoria, el término "polietilenglicol" pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que

se han utilizado para derivatizar otras proteínas, tales como mono alcoxi- o ariloxi-(C1-C10) polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En determinadas realizaciones de la divulgación, el anticuerpo a pegar es un anticuerpo aglicosilado. Métodos para pegar proteínas son conocidos en la técnica y pueden aplicarse a los anticuerpos de la divulgación. Véase, por ejemplo, el documento EP 0154316 de Nishimura et al. y el documento EP 0401384 de Ishikawa et al.

Otra modificación de los anticuerpos que se contempla en la divulgación es un conjugado o una fusión de proteínas de al menos la región de unión al antígeno del anticuerpo de la divulgación a la proteína sérica, tal como albúmina sérica humana o un fragmento de la misma para aumentar la semivida de la molécula resultante. Un enfoque de este tipo se describe, por ejemplo, en Ballance et al. Documento EP0322094.

3. Injerto de dominios de unión a antígeno en marcos o armazones alternativos

Se puede emplear una amplia diversidad de marcos o armazones de anticuerpos/inmunoglobulinas siempre que el polipéptido resultante incluya al menos una región de unión que se una específicamente a IL18 y que no se una al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde la molécula de unión no es IL-18BP. Dichos marcos o armazones incluyen los 5 idiotipos principales de inmunoglobulinas humanas, o fragmentos de las mismas (tales como los divulgados en otra parte en esta memoria), e incluyen inmunoglobulinas de otras especies animales, preferiblemente que tienen aspectos humanizados. Los anticuerpos de una sola cadena pesada, tales como los identificados en camélidos, son de particular interés a este respecto. Los expertos en la técnica siguen descubriendo y desarrollando nuevos marcos, armazones y fragmentos.

3.1) Marcos no inmunoglobulínicos

Se pueden emplear marcos y armazones no inmunoglobulina conocidos o futuros, siempre que comprendan una región de unión específica para IL-18 y que no se unan al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde la molécula de unión no es IL-18BP. Dichos compuestos se denominan en esta memoria "polipéptidos que comprenden una región de unión específica para diana". Los marcos o armazones no inmunoglobulina conocidos incluyen, pero no se limitan a, adnectinas (Adnectins® - Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA), DARPin, avímeros, Affibody® (Affibody AG, Suecia), anticualinas (Pieris Proteolab AG, Freising, Alemania), Affilins® (gamma-cristalina o ubiquitina; Scil Proteins GmbH, Halle, Alemania) y miméticos de epítomos de proteínas (PEM; Polyphor® Ltd, Allschwil, Suiza).

3.2) Moléculas de fibronectina y adnectinas

En un aspecto de la divulgación, la molécula de unión es una molécula de fibronectina. La molécula de fibronectina tiene un armazón basado preferiblemente en el dominio de fibronectina tipo III (p. ej., el décimo módulo de la fibronectina tipo III (dominio 10 Fn3)). En una realización de la divulgación, la molécula de unión es una adnectina (Adnectins®).

El dominio de fibronectina tipo III tiene 7 u 8 cadenas beta que se distribuyen entre dos láminas beta, que se empaquetan entre sí para formar el núcleo de la proteína, y además contienen bucles (análogos a las CDR) que conectan las cadenas beta entre sí y están expuestos a disolventes. Hay al menos tres de estos bucles en cada uno de los bordes del sándwich de láminas beta, en que el borde es el límite de la proteína perpendicular a la dirección de las cadenas beta (documento US 6.818.418).

Estos armazones basados en fibronectina no son una inmunoglobulina, aunque el pliegue general está estrechamente relacionado con el fragmento de anticuerpo funcional más pequeño, la región variable de la cadena pesada, que comprende toda la unidad de reconocimiento de antígeno en IgG de camello y llama. Debido a esta estructura, el anticuerpo que no es de inmunoglobulina imita propiedades de unión al antígeno que son similares en naturaleza y afinidad a las de los anticuerpos. Estos armazones se pueden utilizar en una estrategia de aleatorización de bucle y reordenamiento aleatorio in vitro que es similar al proceso de maduración por afinidad de anticuerpos in vivo. Estas moléculas a base de fibronectina se pueden utilizar como armazones, en que las regiones bucle de la molécula se pueden reemplazar por las CDR de la divulgación utilizando técnicas de clonación estándares.

Por consiguiente, en una realización de la divulgación, la molécula de unión es una molécula de fibronectina que se une (p. ej., se une específicamente) a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP).

En otras realizaciones de la divulgación, la molécula de unión es una adnectina que se une (p. ej., se une específicamente) a IL18 y no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP).

3.3) DARPin

La tecnología se basa en el uso de proteínas con módulos de repetición derivados de anquirina como armazones para que mantengan regiones variables que puedan utilizarse para la unión a diferentes dianas. El módulo de repetición de

anquirina es un polipéptido de 33 aminoácidos que consiste en dos hélices α antiparalelas y una unión de giro β . La unión de las regiones variables se optimiza principalmente mediante el uso de visualización de ribosomas.

Por consiguiente, en una realización de la divulgación, la molécula de unión es una anquirina/DARpins que se une (p. ej., se une específicamente) a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP).

3.4) Avímeros

Los avímeros derivan de proteína natural que contiene dominio A tal como LRP-1. Estos dominios se utilizan por naturaleza para las interacciones proteína-proteína, y en seres humanos a lo largo de 250 proteínas se basan estructuralmente en dominios A. Los avímeros consisten en un cierto número de monómeros (2-10) diferentes de "dominio A" enlazados a través de enlazadores de aminoácidos. Se pueden crear avímeros que se unan al antígeno diana utilizando la metodología descrita, por ejemplo, en los documentos US20040175756; US20050053973; US20050048512; y US20060008844.

Por consiguiente, en una realización de la divulgación, la molécula de unión es un avímero que se une (p. ej., se une específicamente) a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP).

3.5) Affibody®

Affibody® son proteínas pequeñas y simples compuestas por un paquete de tres hélices basado en el armazón de uno de los dominios de unión a IgG de la Proteína A. La Proteína A es una proteína de superficie de la bacteria *Staphylococcus aureus*. Este dominio de armazón consta de 58 aminoácidos, 13 de los cuales se asignan al azar para generar colecciones de Affibody® con un gran número de variantes de ligando (véase, p. ej., el documento US 5.831.012). Las moléculas Affibody® imitan a los anticuerpos; tienen un peso molecular de 6 kDa, en comparación con el peso molecular de los anticuerpos, que es de 150 kDa. A pesar de su pequeño tamaño, el sitio de unión de moléculas Affibody® es similar al de un anticuerpo.

Por consiguiente, en una realización de la divulgación, la molécula de unión es un anticuerpo que se une (p. ej., se une específicamente) a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP).

3.6) Anticalins®

Las Anticalin® son productos desarrollados por la empresa Pieris ProteoLab AG. Derivan de las lipocalinas, un grupo extenso de proteínas pequeñas y robustas que habitualmente están implicadas en el transporte o almacenamiento fisiológico de compuestos químicamente sensibles o insolubles. Varias lipocalinas naturales se encuentran en tejidos humanos o líquidos corporales.

La arquitectura proteica recuerda a las inmunoglobulinas, con bucles hipervariables en la parte superior de un marco rígido. Sin embargo, en contraste con los anticuerpos o sus fragmentos recombinantes, las lipocalinas están compuestas por una sola cadena polipeptídica con 160 a 180 residuos aminoácidos, que son ligeramente más grandes que un solo dominio de inmunoglobulina.

El conjunto de cuatro bucles, que constituye el bolsillo de unión, muestra una plasticidad estructural pronunciada y tolera una diversidad de cadenas laterales. De este modo, el sitio de unión se puede remodelar en un proceso patentado con el fin de reconocer compuestos diana prescritos de diferente forma con alta afinidad y especificidad.

Una proteína de la familia de las lipocalinas, la proteína de unión a la bilina (BBP) de *Pieris Brassicae*, se ha utilizado para desarrollar anticalinas mediante la mutagenización del conjunto de cuatro bucles. Un ejemplo de una solicitud de patente que describe "anticalinas" es PCT WO 199916873.

Por consiguiente, en una realización de la divulgación, la molécula de unión es una anticalina que se une (p. ej., se une específicamente) a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP).

3.7) Affilin®

Las moléculas de Affilin® son pequeñas proteínas no inmunoglobulínicas que están diseñadas para afinidades específicas hacia proteínas y moléculas pequeñas. Las nuevas moléculas de Affilin® pueden seleccionarse muy rápidamente de dos colecciones, cada una de las cuales se basa en una proteína de armazón derivada de seres humanos diferente.

Las moléculas de Affilin™ no muestran ninguna homología estructural con las proteínas de inmunoglobulina. Proteína Scil emplea dos armazones de Affilin™, uno de ellos es cristalina gamma, una proteína estructural humana del cristalino del ojo y el otro es de proteínas de la superfamilia de la "ubiquitina". Ambos armazones humanos son muy pequeños, muestran estabilidad a altas temperaturas y son casi resistentes a los cambios de pH y agentes desnaturizantes. Esta alta estabilidad se debe principalmente a la estructura de lámina beta expandida de las

proteínas. En el documento WO200104144 se describen ejemplos de proteínas gamma derivadas del cristalino y en el documento WO2004106368 se describen ejemplos de proteínas "similares a ubiquitina".

Por consiguiente, en una realización de la divulgación, la molécula de unión es una afilina que se une (p. ej., se une específicamente) a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP).

3.8) Miméticos de Epítopos de Proteínas

Los miméticos de epítopos de proteínas (PEM) son moléculas cíclicas, de tamaño mediano, similares a péptidos (aprox. 1-2 kDa) que imitan las estructuras secundarias de horquilla beta de proteínas, la principal estructura secundaria implicada en las interacciones proteína-proteína.

Por consiguiente, en una realización de la divulgación, la molécula de unión es un mimético de epítopos de proteínas que se une (p. ej., se une específicamente) a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP).

4. Polinucleótidos que codifican las moléculas de unión de la invención

Otro aspecto de la invención se refiere a polinucleótidos aislados que codifican las moléculas de unión de la invención.

Los polinucleótidos de dominio variable de la cadena pesada que codifican los anticuerpos humanos aislados descritos en esta memoria se muestran en SEQ ID NOs: 15, 19, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 84, 88, 91, 94, 113, 131, 139, 146 y 152. Los polinucleótidos de dominio variable de la cadena ligera que codifican los anticuerpos humanos aislados descritos en esta memoria se muestran en SEQ ID NOs: 17, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 86, 89, 92, 95, 115, 133, 141, 148 y 154. Otros polinucleótidos que codifican anticuerpos de la invención incluyen polinucleótidos que han sido mutados, pero que tienen al menos un 60, 70, 80, 90 o 95 por ciento de identidad con las secuencias arriba descritas, tales como polinucleótidos que han sido optimizados para la expresión de proteínas en células de mamíferos, por ejemplo, líneas celulares CHO.

Punto 89: Una variante de ácidos nucleicos, en donde no se han cambiado más de 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos por delección, inserción o sustitución de nucleótidos en las regiones variables en comparación con las regiones variables representadas en las secuencias arriba descritas.

Punto 90: El polinucleótido aislado que codifica el dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la divulgación, en donde el polinucleótido:

a. es al menos 90% idéntico a SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 35 o SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 84 o SEQ ID NO: 88 o SEQ ID NO: 91 o SEQ ID NO: 94 o SEQ ID NO: 113 o SEQ ID NO: 131 o SEQ ID NO: 139 o SEQ ID NO: 146 o SEQ ID NO: 152 o

b. comprende SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 35 o SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 84 o SEQ ID NO: 88 o SEQ ID NO: 91 o SEQ ID NO: 94 o SEQ ID NO: 113 o SEQ ID NO: 131 o SEQ ID NO: 139 o SEQ ID NO: 146 o SEQ ID NO: 152 o

c. consiste esencialmente en SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 35 o SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 84 o SEQ ID NO: 88 o SEQ ID NO: 91 o SEQ ID NO: 94 o SEQ ID NO: 113 o SEQ ID NO: 131 o SEQ ID NO: 139 o SEQ ID NO: 146 o SEQ ID NO: 152.

Punto 91: El polinucleótido aislado que codifica el dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con la divulgación, en donde el polinucleótido:

a. es al menos 90% idéntico a SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 86 o SEQ ID NO: 89 o SEQ ID NO: 92 o SEQ ID NO: 95 o SEQ ID NO: 115 o SEQ ID NO: 133 o SEQ ID NO: 141 o SEQ ID NO: 148 o SEQ ID NO: 154 o

b. comprende SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 86 o SEQ ID NO: 89 o SEQ ID NO: 92 o SEQ ID NO: 95 o SEQ ID NO: 115 o SEQ ID NO: 133 o SEQ ID NO: 141 o SEQ ID NO: 148 o SEQ ID NO: 154 o

c. consiste esencialmente en SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 86 o SEQ ID NO: 89 o SEQ ID NO: 92 o SEQ ID NO: 95 o SEQ ID NO: 115 o SEQ ID NO: 133 o SEQ ID NO: 141 o SEQ ID NO: 148 o SEQ ID NO: 154.

Punto 92: El polinucleótido aislado que codifica la cadena pesada de un anticuerpo de acuerdo con la divulgación, en donde el polinucleótido:

- 5 a. es al menos 90% idéntico a SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 48 o SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 54 o SEQ ID NO: 57 o SEQ ID NO: 101 o SEQ ID NO: 159 o SEQ ID NO: 97 o SEQ ID NO: 104 o SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 143 o SEQ ID NO: 135 o SEQ ID NO: 149 o SEQ ID NO: 155; o
- 10 b. comprende SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 48 o SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 54 o SEQ ID NO: 57 o SEQ ID NO: 101 o SEQ ID NO: 159 o SEQ ID NO: 97 o SEQ ID NO: 104 o SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 143 o SEQ ID NO: 135 o SEQ ID NO: 149 o SEQ ID NO: 155; o
- 15 c. consiste esencialmente en SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 48 o SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 54 o SEQ ID NO: 57 o SEQ ID NO: 101 o SEQ ID NO: 159 o SEQ ID NO: 97 o SEQ ID NO: 104 o SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 143 o SEQ ID NO: 135 o SEQ ID NO: 149 o SEQ ID NO: 155.

Punto 93: El polinucleótido aislado que codifica la cadena ligera de un anticuerpo de acuerdo con la divulgación, en donde el polinucleótido:

- 20 a. es al menos 90% idéntico a SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 49 o SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 55 o SEQ ID NO: 58 o SEQ ID NO: 102 o SEQ ID NO: 161 o SEQ ID NO: 99 o SEQ ID NO: 105 o SEQ ID NO: 119 o SEQ ID NO: 145 o SEQ ID NO: 137 o SEQ ID NO: 151 o SEQ ID NO: 157; o
- 25 b. comprende SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 49 o SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 55 o SEQ ID NO: 58 o SEQ ID NO: 102 o SEQ ID NO: 161 o SEQ ID NO: 99 o SEQ ID NO: 105 o SEQ ID NO: 119 o SEQ ID NO: 145 o SEQ ID NO: 137 o SEQ ID NO: 151 o SEQ ID NO: 157; o
- 30 c. consiste esencialmente en SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 49 o SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 55 o SEQ ID NO: 58 o SEQ ID NO: 102 o SEQ ID NO: 161 o SEQ ID NO: 99 o SEQ ID NO: 105 o SEQ ID NO: 119 o SEQ ID NO: 145 o SEQ ID NO: 137 o SEQ ID NO: 151 o SEQ ID NO: 157.

El polinucleótido puede estar presente en células enteras, en un lisado celular, o puede estar en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un polinucleótido se "aisla" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica lejos de otros componentes celulares u otros contaminantes, p. ej., otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándares, que incluyen tratamiento alcalino/SDS, bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en la técnica. Véase, F. Ausubel, et al., (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York. Un polinucleótido de la divulgación puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede contener o no secuencias intrónicas. En una realización, el polinucleótido es una molécula de ADNc. El polinucleótido puede estar presente en un vector tal como un vector de presentación en fagos, o en un vector plasmídico recombinante.

Los polinucleótidos de la invención se pueden obtener utilizando técnicas estándares de biología molecular. Para los anticuerpos expresados por hibridomas (p. ej., hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que llevan genes de inmunoglobulina humana tal como se describe más adelante), los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo producido por el hibridoma se pueden obtener mediante técnicas de amplificación por PCR o clonación de ADNc estándares. Para los anticuerpos obtenidos de una colección de genes de inmunoglobulina (p. ej., utilizando técnicas de presentación de fagos), los polinucleótidos que codifican el anticuerpo pueden recuperarse de diversos clones de fagos que son miembros de la colección.

Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos VH y VL, estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente mediante técnicas estándares de ADN recombinante, por ejemplo para convertir los genes de la región variable en genes de cadena de anticuerpos de longitud completa, en genes de fragmentos Fab o en un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica VL o VH se enlaza operativamente a otra molécula de ADN, o a un fragmento que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. La expresión "unido de forma funcional", como se usa en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN se unen de una manera funcional, por ejemplo, de modo que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el marco de lectura, o de modo que la proteína se exprese bajo el control de un promotor deseado.

El ADN aislado que codifica la región VH puede convertirse en un gen de la cadena pesada de longitud completa enlazando operativamente el ADN que codifica VH a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena pesada humana son conocidas en la técnica (véase, p. ej., Kabat, E.A., et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N° 91-3242) y fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. En algunas

realizaciones, la región constante de la cadena pesada se selecciona entre los isotipos de IgG1. Para un gen de la cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica VH puede enlazarse operativamente a otra molécula de ADN que codifica solo la región constante CH1 de la cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región VL puede convertirse en un gen de la cadena ligera de longitud completa (así como en un gen de la cadena ligera Fab) enlazando operativamente el ADN que codifica VL a otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena ligera humana son conocidas en la técnica (véase, p. ej., Kabat, E.A., et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N° 91-3242) y fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o una lambda.

Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL se enlazan operativamente a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, p. ej., que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4-Ser)₃, de modo que las secuencias VH y VL pueden expresarse como una proteína de cadena sencilla contigua, con las regiones VL y VH unidas por el enlazador flexible (véase, p. ej., Bird et al., 1988 Science 242: 423-426; Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554).

El polinucleótido de acuerdo con uno cualquiera de los elementos 89 a 93 puede modificarse in-vitro de tal manera que cuando se inyecta en células de mamífero, evita la digestión del polinucleótido y permite que la maquinaria de traducción de la célula de mamífero produzca un anticuerpo a partir del polinucleótido modificado (tal como se describe en la Patente de EE.UU. N° 8.278.036 B2 de Kariko et al.). Un ARN modificado sintetizado in vitro de este tipo se puede inyectar entonces en células de mamífero o en un paciente como parte de una terapia génica.

Por lo tanto, otro aspecto de la presente divulgación abarca un método para inducir a una célula de mamífero a producir un anticuerpo tal como se describe en esta memoria, comprendiendo el método: poner en contacto dicha célula de mamífero con ARN modificado sintetizado in vitro derivado de un polinucleótido de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 89 a 93, en donde dicho ARN modificado sintetizado in vitro comprende una o más modificaciones tal como se describe en la patente de EE.UU. N° 8.278.036 B2.

5. Producción de anticuerpos.

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) se pueden producir mediante una diversidad de técnicas, incluida la metodología convencional de anticuerpos monoclonales, p. ej., la técnica estándar de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein, (1975) Nature 256: 495. Pueden emplearse muchas técnicas para producir anticuerpos monoclonales, p. ej., transformación vírica u oncogénica de linfocitos B.

Protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión son conocidos en la técnica. También son conocidos participantes en la fusión (p. ej., células murinas de mieloma) y procedimientos de fusión.

Anticuerpos monoclonales quiméricos o humanizados de la presente invención pueden prepararse en base a la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se describe arriba. El ADN que codifica la cadena pesada y ligera de las inmunoglobulinas puede obtenerse del hibridoma murino de interés y puede modificarse para contener secuencias de inmunoglobulina no murinas (p. ej., humanas) utilizando técnicas estándares de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas pueden unirse a regiones constantes humanas utilizando métodos conocidos en la técnica (véase, p. ej., la patente de EE.UU. N° 4816567 de Cabilly et al.). Para crear un anticuerpo humanizado, se pueden insertar regiones CDR murinas en una región flanqueante humana empleando métodos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5225539 de Winter, y las patentes de EE.UU. n.º 5530101; 5585089; 5693762 y 6180370 de Queen et al.

Anticuerpos monoclonales humanos pueden generarse utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que llevan partes del sistema inmune humano en lugar del sistema del ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones a los que se alude en esta memoria como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se les alude colectivamente en esta memoria como "ratones Ig humanos".

El HuMAb mouse® (Medarex, Inc.) contiene miniloci del gen de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada (μ y γ) y de cadena ligera κ humanas no reorganizadas, junto con mutaciones fijadas como objetivo que inactivan los loci de la cadena μ y κ endógena (véase, p. ej., Lonberg et al (1994) Nature; 368(6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones exhiben una expresión reducida de IgM o κ de ratón y, en respuesta a la inmunización, los transgenes de la cadena pesada y ligera humana introducidos se someten a cambio de clase y mutación somática para generar IgG κ humana monoclonal de alta afinidad (Lonberg, N et al (1994) supra; revisado en Lonberg, N (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N y Huszar, D (1995) Intern Rev Immunol;13: 65-93, y Harding, F y Lonberg, N (1995) Ann N Y Acad Sci; 764:536-546). La preparación y el uso de ratones HuMAb, y las modificaciones genómicas llevadas por estos ratones se describen adicionalmente en Taylor, L et al; (1992) Nucl Acids Res; 20:6287-6295; Chen, J et al (1993) Int Immunol; 5: 647-656; Tuaille et al (1993)

Proc Natl Acad Sci USA ; 94:3720-3724; Choi et al (1993) Nature Gen ; 4:117-123; Chen, J et al (1993) EMBO J ; 12: 821-830; Tuailon et al (1994) J Immunol ; 152:2912-2920; Taylor, L et al (1994) Int Immuno; 6:579-591; y Fishwild, D et al (1996) Nature Biotech; 14: 845-851,. Véanse, además, las Patentes de EE.UU. N° 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas de Lonberg y Kay; la Patente de EE.UU. N° 5.545.807 de Surani et al; las Publicaciones PCT N° WO 92103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97113852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas de Lonberg y Kay; y la Publicación PCT N° WO 01/14424 de Korman et al.

En una realización de la divulgación, los anticuerpos humanos de acuerdo con la invención pueden generarse utilizando un ratón que porta secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tal como un ratón que porta un transgén de la cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana. Dichos ratones, denominados en esta memoria "ratones KM", se describen en detalle en la publicación PCT WO 02/43478 de Ishida et al.

Aún más, los sistemas animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y pueden utilizarse para generar anticuerpos de la invención. Por ejemplo, se puede utilizar un sistema transgénico alternativo denominado Xenomouse (Abgenix, Inc.). Dichos ratones se describen, p. ej., en las patentes de EE.UU. N° 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6, 150.584 y 6.162.963 de Kucherlapati et al.

Aún más, los sistemas de animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y pueden utilizarse para generar anticuerpos de la invención. Por ejemplo, pueden utilizarse ratones que llevan tanto un transcromosoma de cadena pesada humana como un transcromosoma de cadena ligera humana, a los cuales se alude como "ratones TC"; ratones de este tipo se describen en Tomizuka et al., 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Además, vacas que llevan transcromosomas humanos de cadena pesada y ligera se han descrito en la técnica (Kuroiwa et al., 2002 Nature Biotech 20:889-894).

Anticuerpos recombinantes humanos de la invención también se pueden preparar utilizando métodos de presentación en fagos para el rastreo de genotecas de inmunoglobulina humana. Mtodos de presentación en fagos de este tipo para aislar anticuerpos humanos se establecen en la técnica o se describen en los ejemplos que figuran más adelante. Véanse, por ejemplo: Patentes de EE.UU. N° 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 de Ladner et al.; Patentes de EE.UU. N° 5.427.908 y 5.580.717 de Dower et al.; Patentes de EE.UU. N° 5.969.108 y 6.172.197 de McCafferty et al.; y Patentes de EE.UU. N° 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 de Griffiths et al.

Anticuerpos monoclonales humanos de la invención también se pueden preparar utilizando ratones SCID en los que células inmunes humanas se han reconstituido de modo que se pueda generar una respuesta de anticuerpos humanos tras la inmunización. Ratones de este tipo se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N° 5.476.996 y 5.698.767 de Wilson et al.

Anticuerpos de la invención también pueden producirse en un transfectoma de células huésped utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección génica como es bien conocido en la técnica (p. ej., Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos de los mismos, se pueden obtener ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas de longitud parcial o completa mediante técnicas estándares de biología molecular (p. ej., amplificación por PCR o clonación de ADNc utilizando un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés) y los ADN pueden insertarse en vectores de clonación o expresión, de modo que los genes estén enlazados operativamente a secuencias de control transcripcionales y traduccionales. En este contexto, la expresión "enlazado operativamente" pretende significar que un gen de anticuerpo se liga en un vector de modo que las secuencias de control de la transcripción y la traducción dentro del vector cumplen su función pretendida de regular la transcripción y traducción del gen de anticuerpo. El vector de clonación o expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para que sean compatibles con la célula huésped de expresión utilizada. El gen de cadena ligera del anticuerpo y el gen de cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores distintos o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante métodos convencionales (p. ej., ligamiento de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen del anticuerpo y el vector, o ligamiento de extremo romos si no hay presentes sitios de restricción). Las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en esta memoria pueden utilizarse para crear genes de anticuerpos de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y constantes de cadena ligera del isotipo deseado, de modo que el segmento VH está operativamente enlazado al segmento o segmentos CH dentro del vector y el segmento VL está enlazado operativamente al segmento CL dentro del vector. Adicional o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpos desde una célula huésped. El gen de la cadena del anticuerpo puede clonarse en el vector de modo que el péptido señal se una en el mismo marco al extremo amino del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína que no es inmunoglobulina).

En un aspecto, la invención proporciona un vector de clonación o expresión que comprende uno o más polinucleótidos de acuerdo con la invención.

Punto 94: El vector de clonación o expresión que comprende al menos un polinucleótido seleccionado de: SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 48 o SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 54 o SEQ ID NO: 57 o SEQ ID NO: 101 o SEQ ID NO: 159 o SEQ ID NO: 97 o SEQ ID NO: 104 o SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 143 o SEQ ID NO: 135 o SEQ ID NO: 149 o SEQ ID NO: 155 o SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 49 o SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 55 o SEQ ID NO: 58 o SEQ ID NO: 102 o SEQ ID NO: 161 o SEQ ID NO: 99 o SEQ ID NO: 105 o SEQ ID NO: 119 o SEQ ID NO: 145 o SEQ ID NO: 137 o SEQ ID NO: 151 o SEQ ID NO: 157.

Además de los polinucleótidos que codifican las cadenas de anticuerpos, los vectores de clonación o expresión de la invención llevan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena de anticuerpos en una célula huésped. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (p. ej., señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Secuencias reguladoras de este tipo se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA 1990). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Secuencias reguladoras para la expresión en células huésped de mamífero incluyen elementos víricos que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus del simio 40 (SV40), adenovirus (p. ej., el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y polioma. Como alternativa, pueden utilizarse secuencias reguladoras no víricas, tales como el promotor de la ubiquitina o el promotor de P-globina. Aún más, los elementos reguladores compuestos de secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor SRa, que contiene secuencias del promotor temprano SV40 y la repetición terminal larga del virus de la leucemia de células T humanas tipo 1 (Takebe, Y. et al., 1988 Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

Además, los vectores de clonación o expresión de la invención pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (p. ej., orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (véanse, p. ej., las Patentes de EE.UU. Nº 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas por Axel et al.) Por ejemplo, típicamente, el gen marcador de selección confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedadora en que se ha introducido el vector. Genes marcadores seleccionables incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped dhfr- con selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para selección con G418).

Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, el o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesadas y ligeras se transfectan en una célula huésped mediante técnicas estándares. Se pretende que las diversas formas del término "transfección" engloben una amplia diversidad de técnicas habitualmente utilizadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Teóricamente es posible expresar los anticuerpos de la invención en células huésped procariotas o eucariotas. La expresión de anticuerpos en células eucariotas, por ejemplo, células huésped de mamífero, levaduras u hongos filamentosos, se analiza porque dichas células eucariotas y, en particular, células de mamífero, tienen mayor probabilidad que las células procariotas de ensamblar y secretar el anticuerpo plegado apropiadamente e inmunológicamente activo. Se ha informado que la expresión procariota de genes de anticuerpos es ineficaz para la producción de altos rendimientos de anticuerpos activos (Boss, M. A. y Wood, C. R., 1985 Immunology Today 6:12-13).

Células huésped adecuadas para clonar o expresar vectores que codifican anticuerpos de la invención son células procariotas, de levadura o eucariotas superiores. Células procariotas adecuadas incluyen eubacterias, p.ej., enterobacteriaceae, tales scherichia, p.ej., E. coli (por ejemplo, ATCC 31, 446; 31, 537; 27,325), Enterobacter, Erwinia, Klebsiella proteus, Salmonella, p. ej. Salmonella typhimurium, Serratia, p. ej. Serratia marcescens y Shigella así como bacilos, tales como B. subtilis y B. licheniformis (véase el documento DD 266 710), Pseudomonas, tales como P. aeruginosa y Streptomyces. De las células huésped de levadura u hongos, también se contemplan Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Kluyveromyces (p. ej., ATCC 16,045; 12,424; 24178; 56,500), Yarrowia (EP402, 226), Pichia pastoris (EP183070, véase también Peng et al (2004) J Biotechnol; 108:185-192), Candida, Trichoderma reesei (EP244234), Penicillium, Tolypocladium y huéspedes de Aspergillus, tales como A. nidulans y A. niger.

Aunque las células huésped procariotas y de levadura están específicamente contempladas por la invención, preferiblemente, sin embargo, las células huésped de la presente invención son células eucariotas superiores.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona una célula huésped que comprende uno o más vectores de clonación o expresión que comprenden los polinucleótidos como se describen en esta memoria.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula huésped transformada o transfectada de manera estable que comprende uno o más polinucleótidos tal como se describen en esta memoria.

Punto 95: Una célula huésped transformada de manera estable que comprende un vector que codifica una cadena pesada y/o cadena ligera del anticuerpo aislado o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 88. Preferiblemente, células huésped de este tipo comprenden un primer vector que codifica la cadena ligera y un segundo vector que codifica dicha cadena pesada.

Células huésped eucariotas superiores adecuadas incluyen células de mamífero tales como COS-1 (ATCC N° CRL 1650) COS-7 (ATCC CRL 1651), línea de riñón embrionario humano 293, células de riñón de hámster bebé (BHK) (ATCC CRL 1632), BHK570 (ATCC NO: CRL 10314), 293 (ATCC NO CRL 1573), células de ovario de hámster chino CHO (p. ej. CHO-K1, ATCC NO: CCL 61, línea celular DHFR-CHO, tal como DG44 (véase Urlaub et al, (1986)) Somatic Cell Mol.Genet.12, 555-556)), particularmente aquellas líneas celulares CHO adaptadas para cultivo en suspensión, células de Sertoli de ratón, células de riñón de mono, células de riñón de mono verde africano (ATCC CRL-1587), células HELA, células de riñón canino (ATCC CCL 34), células de pulmón humano (ATCC CCL 75), células Hep G2 y mieloma o linfoma, p. ej., NSO (véase el documento US5807715), Sp2 / 0, YO.

Preferiblemente, las células huésped de mamífero para expresar la molécula de unión de la invención incluyen líneas celulares de mamífero deficientes para la expresión del gen FUT8, por ejemplo tal como se describe en el documento US6946292.

Células huésped transformadas con vectores que codifican las moléculas de unión pueden cultivarse mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Células huésped pueden cultivarse en matraces giratorios, botellas giratorias o sistemas de fibra hueca, pero se prefiere para la producción a gran escala que reactores de tanque agitado se utilicen particularmente para cultivos en suspensión. Preferiblemente, los tanques agitados están adaptados para la aireación utilizando, p. ej., burbujeadores, deflectores o impulsores de bajo cizallamiento. Para columnas de burbujas y reactores de transporte aéreo, se puede utilizar la aireación directa con burbujas de aire u oxígeno. En los casos en los que las células huésped se cultivan en un medio de cultivo libre de suero, se prefiere que el medio se complemente con un agente protector de la célula, tal como pluronic F-68 para ayudar a prevenir el daño celular como resultado del proceso de aireación. Dependiendo de las características de la célula huésped, pueden utilizarse microportadores como sustratos de crecimiento para líneas celulares dependientes del anclaje o las células pueden adaptarse al cultivo en suspensión (lo cual es típico). El cultivo de células huésped, en particular células huésped de invertebrados, puede utilizar una diversidad de modos operativos, tales como alimentación por lotes, procesamiento por lotes repetido (véase Drapeau *et al* (1994) cytotechnology 15: 103-109), proceso por lotes extendido o cultivo de perfusión. Aunque las células huésped de mamíferos transformadas de forma recombinante pueden cultivarse en medios que contienen suero, tal como suero de ternero fetal (FCS), se prefiere que tales células huésped se cultiven en medios libres de suero sintético tal como se describe en Keen *et al* (1995) Cytotechnology 17:153-163, o medios disponibles comercialmente, tales como ProCHO-CDM o UltraCHO (TM) (Cambrex NJ, EE.UU.), complementados cuando sea necesario con una fuente de energía tal como glucosa y factores de crecimiento sintéticos tales como la insulina recombinante. El cultivo libre de suero de células huésped puede requerir que esas células estén adaptadas para crecer en condiciones libres de suero. Un enfoque de adaptación es cultivar células huésped de este tipo en medios que contienen suero e intercambiar repetidamente el 80% del medio de cultivo por medios libres de suero, de modo que las células huésped aprendan a adaptarse en condiciones libres de suero (véase, p. ej., Scharfenberg K *et al* (1995) en Animal Cell technology: Developments towards the 21st century (Beuvery E.G. *et al* eds), págs. 619-623, editoriales académicas Kluwer).

Las moléculas de unión de la invención secretadas en los medios pueden recuperarse y purificarse utilizando una diversidad de técnicas para proporcionar un grado de purificación adecuado para el uso pretendido. Por ejemplo, el uso de anticuerpos aislados de la invención para el tratamiento de pacientes humanos típicamente exige al menos un 95% de pureza, más típicamente un 98% o 99% o más de pureza (en comparación con el medio de cultivo bruto). En primera instancia, los desechos celulares del medio de cultivo se separan típicamente mediante centrifugación, seguido de una etapa de clarificación del sobrenadante utilizando, p. ej., microfiltración, ultrafiltración y/o filtración profunda. Se encuentra disponible una diversidad de otras técnicas, tales como la diálisis y la electroforesis en gel y técnicas cromatográficas, tales como el hidroxipatito (HA), la cromatografía de afinidad (opcionalmente con un sistema de etiquetado de afinidad tal como polihistidina) y/o la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, véase el documento US5429746). En una realización de la divulgación, los anticuerpos de la invención, después de diversas etapas de clarificación, se capturan utilizando cromatografía de afinidad de proteína A o G, seguido de etapas de cromatografía adicionales, tales como intercambio de iones y/o cromatografía de HA, intercambio de aniones o cationes, cromatografía de exclusión por tamaño y precipitación con sulfato de amonio. Típicamente, también se emplean diversas etapas de separación de virus (p. ej., nanofiltración utilizando, p. ej., un filtro DV-20). Siguiendo estas diversas etapas, se proporciona una preparación purificada (preferiblemente monoclonal) que comprende al menos 75 mg/ml o más, p. ej., 100 mg/ml o más del anticuerpo aislado de la invención o el fragmento de unión al antígeno del mismo y, por lo tanto, forma una realización de la divulgación. Adecuadamente, preparaciones de este tipo están sustancialmente libres de formas agregadas de anticuerpos de la invención.

Los sistemas bacterianos pueden utilizarse para la expresión de moléculas de unión no inmunoglobulina arriba descritas. Los sistemas bacterianos también son particularmente adecuados para la expresión de fragmentos de

anticuerpos aislados. Fragmentos de este tipo se localizan intracelularmente o dentro del periplasma. Las proteínas periplásmicas insolubles se pueden extraer y replegar para formar proteínas activas de acuerdo con los métodos conocidos por los expertos en la materia, véase Sanchez *et al* (1999) J.Biotechnol. 72, 13-20 y Cu pit PM *et al* (1999) Lett Appl Microbiol, 29, 273-277.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una molécula de unión que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), en donde el método comprende cultivar una célula huésped bajo condiciones adecuadas para producir la molécula de unión, en donde la célula huésped comprende un vector como se describe en esta memoria.

Punto 95: El método para producir un anticuerpo humano o un fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 88, en el que el método comprende cultivar una célula huésped en condiciones adecuadas para producir la molécula de unión, en donde la célula huésped comprende un vector tal como se describe en esta memoria.

6. Composiciones farmacéuticas

La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden la molécula de unión que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde la molécula de unión no es IL-18BP, y un soporte farmacéuticamente aceptable.

Punto 96: Las composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo humano o un fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 88 y un soporte farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones pueden contener adicionalmente otros agentes terapéuticos que son adecuados para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno humano que se indica más adelante. Soportes farmacéuticos potencian o estabilizan la composición, o facilitan la preparación de la composición. . Soportes farmacéuticamente aceptables incluyen disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles.

Una composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar mediante varios métodos conocidos en la técnica. La vía y/o modo de administración varían dependiendo de los resultados deseados. Se prefiere que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, o que se administre de forma próxima al sitio de la diana. El soporte farmacéuticamente aceptable debe ser adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (*p. ej.*, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la ruta de administración, el compuesto activo (particularmente las entidades químicas de bajo peso molecular) puede recubrirse en un material para proteger al compuesto de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

La composición debe ser estéril y fluida. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de surfactantes. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio en la composición. La absorción a largo plazo de las composiciones inyectables se puede conseguir incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar de acuerdo con métodos muy conocidos y practicados de forma rutinaria en la técnica. Véase, *p. ej.*, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, Mack Publishing Co., 20ª ed., 2000; y *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978. Las composiciones farmacéuticas se fabrican preferiblemente en condiciones de GMP. . Típicamente, una dosis terapéuticamente efectiva o una dosis eficaz de un anticuerpo de la invención descrita en esta memoria se emplea en las composiciones farmacéuticas de la invención. Se formulan típicamente en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Las pautas posológicas se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (*p. ej.*, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o incrementar de forma proporcional la dosis según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Resulta especialmente favorable formular composiciones parenterales en una forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Forma de dosificación unitaria, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada una de las unidades contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el soporte farmacéutico requerido.

Los niveles de dosis reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden modificar con el fin de obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición y un modo de administración particulares, sin que sean tóxicos para el paciente. El nivel de dosis seleccionado depende de diversos factores farmacocinéticos, que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, la sal o amida de estas,

la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se esté empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el género, el peso, la afección, el estado general de salud y el historial médico previo del paciente que se esté tratando, y factores similares.

Un médico puede comenzar las dosis de los anticuerpos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado. En general, las dosis efectivas de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de una enfermedad o trastorno fibrótico descritos en esta memoria varían dependiendo de muchos factores diferentes, que incluyen medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otros medicamentos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Las dosis del tratamiento deben ser tituladas para optimizar su seguridad y eficacia. Para la administración con un anticuerpo, la dosis varía en el intervalo de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg, de peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o de 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ilustrativo implica la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses.

Las moléculas de unión de la invención, especialmente los anticuerpos y fragmentos de los mismos, se administran habitualmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis individuales pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo los niveles en sangre de proteína terapéutica en el paciente. En algunos métodos, la dosis se ajusta para lograr una concentración de anticuerpos en plasma de 1-1000 µg/ml y en algunos métodos de 25-300 µg/ml. Alternativamente, los anticuerpos de la invención pueden administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanizados presentan una semivida más prolongada que la de los anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosis y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas (preventivas), se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente poco frecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes siguen recibiendo el tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, en ocasiones se requiere una dosis relativamente elevada con intervalos relativamente cortos hasta que la evolución de la enfermedad se reduzca o termine, y preferentemente hasta que el paciente muestre una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, se puede administrar al paciente un régimen profiláctico.

La composición farmacéutica puede comprender (p. ej., como su único ingrediente terapéuticamente activo) una molécula de unión que se une con IL18 (p. ej., se une específicamente) y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), en donde la molécula de unión no es IL-18BP, en donde la molécula de unión se selecciona de: un anticuerpo aislado, un fragmento de un anticuerpo aislado, un anticuerpo de dominio variable único, un anticuerpo biespecífico o multiespecífico, un anticuerpo multivalente, un anticuerpo de dominio variable doble, un inmuno-conjugado, una molécula de fibronectina, una adnectina, un DARPIn, un avímero, un aficuerpo, una anticalina, una afilina, un mimético de epítipo proteico o combinaciones de los mismos y en donde la composición puede comprender, además, un soporte farmacéuticamente aceptable.

Típicamente, la composición estará en una forma administrable por vía intravenosa, inhalable o subcutánea. En otras realizaciones, la composición puede estar en forma liofilizada.

Preferiblemente, la molécula de unión es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal intacto (p. ej., humano, humanizado o quimérico) o un fragmento del mismo tal como se describe en esta memoria.

Punto 97: Una composición farmacéutica comprende (p. ej., como su único ingrediente terapéuticamente activo) un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a IL18 (p. ej., se une específicamente) y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), en donde dicho anticuerpo comprende:

(a) CDRH1 de SEQ ID NO:3;

(b) CDRH2 de SEQ ID NO:9;

(c) CDRH3 de SEQ ID NO:5;

(d) CDRL1 de SEQ ID NO:6;

(e) CDRL2 de SEQ ID NO:7; y

(f) CDRL3 de SEQ ID NO:8.

Punto 98: La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 97, en donde el anticuerpo compite con el anticuerpo murino 125-2H para unirse a IL-18.

Punto 99: Una composición farmacéutica comprende (p. ej., como su único ingrediente terapéuticamente activo) un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a IL18 (p. ej., se une específicamente) y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), en donde dicho anticuerpo comprende;

(a) CDRH1 de SEQ ID NO:3;

(b) CDRH2 de SEQ ID NO:10;

(c) CDRH3 de SEQ ID NO:5;

(d) CDRL1 de SEQ ID NO:6;

(e) CDRL2 de SEQ ID NO:7; y

(f) CDRL3 de SEQ ID NO:8.

Punto 100: Una composición farmacéutica comprende (p. ej., como su único ingrediente terapéuticamente activo) un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a IL18 (p. ej., se une específicamente) y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), en donde dicho anticuerpo comprende;

(a) CDRH1 de SEQ ID NO:3;

(b) CDRH2 de SEQ ID NO:13;

(c) CDRH3 de SEQ ID NO:5;

(d) CDRL1 de SEQ ID NO:6;

(e) CDRL2 de SEQ ID NO:7; y

(f) CDRL3 de SEQ ID NO:8.

Punto 101: La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 100, en donde el anticuerpo compite con el anticuerpo murino 125-2H para unirse a IL-18.

Punto 102: Una composición farmacéutica comprende (p. ej., como su único ingrediente terapéuticamente activo) un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a IL18 (p. ej., se une específicamente) y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), en donde dicho anticuerpo comprende;

(a) CDRH1 de SEQ ID NO:106;

(b) CDRH2 de SEQ ID NO:107;

(c) CDRH3 de SEQ ID NO:108;

(d) CDRL1 de SEQ ID NO:109;

(e) CDRL2 de SEQ ID NO:110; y

(f) CDRL3 de SEQ ID NO:111.

Punto 103: Una composición farmacéutica comprende (p. ej., como su único ingrediente terapéuticamente activo) un anticuerpo que se une a IL18 (p. ej., se une específicamente) y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), en donde dicho anticuerpo comprende:

a. un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 14 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 16 o

b. un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 25 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 16 o

c. un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 28 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 16 o

- d. un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 18 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 20 o
- 5 e. un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 37 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 20 o
- f. un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 40 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 20 o
- 10 g. un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 112 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 114.
- Punto 104: La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 103, en donde dicho anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 14 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 16 o un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 18 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 20.
- 15 Punto 105: La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 104, en donde el anticuerpo compite con el anticuerpo murino 125-2H para unirse a IL-18.
- 20 Punto 106: Una composición farmacéutica comprende (p. ej., como su único ingrediente terapéuticamente activo) un anticuerpo que se une a IL18 (p. ej., se une específicamente) y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), en donde dicho anticuerpo comprende:
- 25 a. un dominio variable de cadena pesada capaz de ser codificado por un polinucleótido aislado que tiene al menos un 90% de identidad (p. ej., 95% o más, tal como 96%, 97%, 98% o 99%) a un polinucleótido aislado que codifica SEQ ID NO: 14 o 18 o 25 o 28 o 37 o 40 o 112 y
- 30 b. un dominio variable de cadena ligera capaz de ser codificado por un polinucleótido aislado que tiene al menos un 90% de identidad (p. ej., 95% o más, tal como 96%, 97%, 98% o 99%) a un polinucleótido aislado que codifica SEQ ID NO: 16 o 20 o 114.
- Punto 107: Una composición farmacéutica comprende (p. ej., como su único ingrediente terapéuticamente activo) un anticuerpo que se une a IL18 (p. ej., se une específicamente) y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), en donde dicho anticuerpo comprende:
- 35 a. una cadena pesada de SEQ ID NO: 43 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 45 o
- b. una cadena pesada de SEQ ID NO: 47 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 45 o
- 40 c. una cadena pesada de SEQ ID NO: 50 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 45 o
- d. un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 53 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 160 o
- 45 e. un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 100 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 160 o
- f. un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 158 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 160 o
- 50 g. un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 116 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 118.
- Punto 108: La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 107, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada de SEQ ID NO: 43 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 45 o un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 158 y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 160.
- 55 Punto 109: La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 108, en donde el anticuerpo compite con el anticuerpo murino 125-2H para unirse a IL-18.
- 60 Punto 110: Una composición farmacéutica comprende (p. ej., como su único ingrediente terapéuticamente activo) un anticuerpo que se une a IL18 (p. ej., se une específicamente) y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), en donde dicho anticuerpo comprende:

a. una cadena pesada capaz de ser codificado por un polinucleótido aislado que tiene al menos un 90% de identidad (p. ej., 95% o más, tal como 96%, 97%, 98% o 99%) a un polinucleótido aislado que codifica SEQ ID NO: 43 o 47 o 50 o 53 o 100 o 116 o 158 y

5 b. una cadena ligera capaz de ser codificado por un polinucleótido aislado que tiene al menos un 90% de identidad (p. ej., 95% o más, tal como 96%, 97%, 98% o 99%) a un polinucleótido aislado que codifica SEQ ID NO: 45 o 160 o 118.

7. Usos clínicos

10 Se ha demostrado que la expresión de IL-18 está regulada al alza en varias enfermedades autoinmunes, cardiovasculares e inflamatorias.

15 Por consiguiente, se pueden utilizar en terapia las moléculas de unión que se unen a IL-18 y que no se unen al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde las moléculas de unión no son IL-18BP

Punto 110: El anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 88 para uso en terapia.

20 En un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para tratar y/o prevenir enfermedades autoinmunes, que incluyen artritis reumatoide (RA), artritis juvenil de inicio sistémico (SOJA), artritis idiopática juvenil sistémica (SJIA), espondilitis anquilosante, enfermedad (autoinmune del oído interno (AIED), síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS), enfermedad de Behcet, enfermedad de Berger (nefropatía por IgA), penfigoide ampolloso, síndrome de Churg Strauss, colitis, enfermedad de Crohn (CD), diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, síndrome de Sjögren (SS), enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), glomerulonefritis, lupus, esclerosis múltiple (MS),
25 psoriasis, fiebre reumática, sarcoidosis, esclerodermia, enfermedad de inicio en adultos (AOSD), lupus eritematoso sistémico (SLE), colitis ulcerosa, linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH, también conocida como síndrome hemofagocítico, síndrome de activación de macrófagos), linfohistiocitosis hemofagocítica familiar (FHL) y otros síndromes de inmunodeficiencia, arteritis de células gigantes (GCA), enfermedad de la arteria coronaria (CAD), vasculopatía coronaria (CV), síndromes coronarios agudos (ACS), insuficiencia cardíaca congestiva (CHF),
30 aterosclerosis, arteriosclerosis, infarto de miocardio (MI), síndrome cardiorrenal (CRS), lesión renal aguda (AKI), nefropatía diabética, resistencia a la insulina, obesidad y síndrome metabólico (MetS), enfermedades pulmonares, incluyendo sarcoidosis pulmonar, en particular sarcoidosis pulmonar, fibrosis pulmonar, asma, especialmente asma grave, uveítis, atrofia geográfica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), fibrosis quística, síndrome de dificultad respiratoria del adulto (ARDS), lesión pulmonar aguda (ALI), lesión pulmonar inducida por el ventilador (VILI),
35 hipertensión arterial pulmonar (PAH), enfermedad de Alzheimer (AD) y sepsis y cualquier combinación de los mismos, método que comprende administrar a un paciente mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula de unión (p. ej., un anticuerpo) o composición farmacéutica tal como se describe en esta memoria que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP).

40 Punto 111: La molécula de unión o las composiciones farmacéuticas de la invención que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde la molécula de unión no es IL-18BP para uso en el tratamiento y/o la prevención de la sarcoidosis, en particular la sarcoidosis pulmonar, la linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH), la linfohistiocitosis hemofagocítica familiar (FHL), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedad de Still de inicio en adultos (AOSD), artritis idiopática juvenil sistémica (SJIA), asma grave,
45 uveítis, atrofia geográfica (GCA), diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, y cualquier combinación de las mismas en un paciente mamífero.

Punto 112: El anticuerpo o la composición farmacéutica según se describe en uno cualquiera de los puntos 1 a 88 o 96 a 110 que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y en donde la molécula de unión no es IL-18BP para uso en el tratamiento y/o la prevención de la sarcoidosis, en particular la sarcoidosis pulmonar, la linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH), la linfohistiocitosis hemofagocítica familiar (FHL),
50 enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedad de Still de inicio en adultos (AOSD), aterosclerosis, artritis idiopática juvenil sistémica (SJIA), asma grave, uveítis, atrofia geográfica, atrofia geográfica (GCA), diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, y cualquier combinación de las mismas en un paciente mamífero.

8. Usos diagnósticos y kits

Una de las ventajas de la molécula de unión o anticuerpo aislado o fragmento del mismo tal como se describe en esta memoria es que se unen a IL-18, pero no se unen al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP) y que no
60 son IL-18BP. Por lo tanto, la molécula de unión o el anticuerpo aislado o fragmento del mismo tal como se describe en esta memoria son capaces de detectar solo IL-18 libre, no unida a IL-18BP. Como la IL-18 libre es la molécula biológicamente activa, se hace evidente de inmediato que una molécula de unión capaz de reconocer solo dicha entidad puede permitir la diferenciación de la IL-18 libre de la IL-18 unida a IL-18BP, que está inactiva. Además, dado que las moléculas de unión de la divulgación no abarcan la IL-18BP, ya sea aislada o que se produce de forma natural,
65 se prestan no solo como agentes terapéuticos, sino también como herramientas en muchas otras aplicaciones, tal como en el diagnóstico o en un kit de diagnóstico.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente divulgación proporciona moléculas de unión o anticuerpos aislados o fragmentos de los mismos que se unen a IL-18 y que no se unen al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), en donde la molécula de unión no es IL-18BP, para uso en diagnóstico o para uso en un kit de diagnóstico.

Las moléculas de unión o el anticuerpo aislado o un fragmento del mismo tal como se describe en esta memoria pueden utilizarse en combinación con la detección de anticuerpos en ensayos ELISA, transferencias Western, etc. y pueden utilizarse solo para detectar la presencia de IL-18 libre pero también para medir la cantidad de IL-18 libre.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente divulgación proporciona moléculas de unión o anticuerpos aislados o fragmentos de los mismos que se unen a IL-18 y que no se unen al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), en donde la molécula de unión no es IL-18BP, para uso en diagnóstico o para uso en detectar y/o medir la presencia y/o la cantidad de IL-18 libre (es decir, IL-18 no unida a IL-18BP) en una muestra.

En aún un aspecto adicional de la presente divulgación, se proporciona un método para detectar y/o medir la presencia y/o cantidad de IL-18 libre (es decir, IL-18 no unida a IL-18BP) en una muestra, en donde la muestra es opcionalmente una muestra humana, en donde el método comprende poner en contacto la muestra con la molécula de unión o un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), en donde la molécula de unión no es IL-18BP.

En aún un aspecto adicional de la presente divulgación, se proporciona un método que comprende las etapas de:

a. poner en contacto una muestra obtenida de un sujeto (p. ej., un sujeto afectado con una enfermedad o trastorno inflamatorio) con la molécula de unión o el anticuerpo aislado o un fragmento del mismo tal como se describe en esta memoria, que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), en donde la molécula de unión no es IL-18BP;

b. medir el nivel de IL-18 libre;

c. opcionalmente, medir el nivel de IL-18 total e IL-18 BP;

d. en donde las etapas b) y c) pueden llevarse a cabo simultánea o consecutivamente o en orden inverso (p. ej., etapa b) antes de la etapa c) o etapa c) antes de la etapa b).

La muestra puede ser una muestra aislada de un cuerpo de mamífero, preferiblemente de un cuerpo humano. La muestra aislada puede ser:

de un sitio del cuerpo accesible, por ejemplo, una membrana mucosa de la nariz, piel, conjuntiva, boca o garganta, ano, vagina, uretra, cuello uterino; y/o

ii. comprende un fluido o semisólido (por ejemplo, un fluido corporal o semisólido, p. ej., evacuación, vómito, secreción, excreta, jugos gástricos y/o intestinales, esputo, sangre, suero sanguíneo, plasma, orina, lágrimas, líquido sinovial, semen, fluido prostático, saliva, homogeneizado de tejidos o moco); y/o

iii. comprende un sólido (p. ej., muestra de heces, tejido o biopsia); y/o

iv. comprende un cultivo (p. ej., cultivo de macrófagos);

La muestra puede ser sangre humana o una parte de la sangre humana tal como plasma.

La muestra aislada puede seleccionarse preferiblemente de sangre entera humana, macrófagos derivados de monocitos de sangre humana y macrófagos de pulmón humano.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona, además, un kit de diagnóstico que comprende la molécula de unión o el anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a IL-18 y que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP), en donde la molécula de unión no es IL-18BP y/o el complejo que comprende IL-18 y esa molécula de unión en donde el kit comprende opcionalmente un primer compuesto de control.

Un compuesto de control es un compuesto que indicará que el kit de diagnóstico está funcionando. Un compuesto de control puede ser positivo o negativo y verificará que cualquier resultado sea válido.

El primer compuesto de control puede ser IL-18 libre y el kit puede comprender, opcionalmente, un segundo compuesto de control que es el anticuerpo murino 125-2H.

En otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un dispositivo médico o de diagnóstico que comprende la molécula de unión o el anticuerpo aislado o un fragmento del mismo (que se une a IL-18 y que no se une al complejo

de proteína de unión a IL-18/IL-18 (IL-18 BP)), y/o el complejo, en donde la molécula de unión no es IL-18BP que comprende IL-18 y esa molécula de unión.

9. Ejemplificación

Las secuencias de los anticuerpos de la presente divulgación ejemplificada en esta memoria, junto con una tabla de correlación de secuencias se describen hacia el final de esta memoria descriptiva.

9.1) Materiales

IL-18 humana recombinante (generada en *E. coli* utilizando el método descrito por Liu et al (2000) Cytokine 12(10):1519-25).

IL18 de cynomolgus recombinante (generada en *E. coli* utilizando el método descrito en la patente de EE.UU. número 6.432.678)

TNF α humano recombinante (R&D n° 210-TA)

Proteína de unión a IL-18 humana recombinante-IgG₁ Fc (hIL-18BP α -Fc, R&D Systems n° 119-BP-100)

IgG₁ IL-18 anti-humana de ratón (125-2H; R&D Systems n° D044-3)

Anticuerpo humano anti-lisozima (MOR03207 Morphosys)

Línea celular KG-1 (ATCC n° CCL-246)

Medios celulares: RPMI 1640 (Invitrogen n° 31870) complementado con suero bovino fetal al 10% (Invitrogen n° 10108-157), L-glutamina al 1% (Invitrogen n° 25030-03), penicilina/estreptomycin al 1% (Invitrogen n° 15140-148).

Placas de 96 pocillos de fondo plano tratadas con cultivo de tejidos (Costar n° 3596)

Ensayo ELISA DuoSet con IFN γ humano (R&D n° DY285)

Placas de microtitulación Maxisorb (Sigma n° M9410)

Heparina (Sigma n° H3393)

IL-12 Recombinant humano (R&D Systems n° 219-IL-CF)

LPS (Sigma n° L4516)

Tubos Falcon (Corning n° 430829)

Ficoll-Paque TM Plus (GE Healthcare Life Sciences n° 17-1440-02)

Las células KG-1 se mantuvieron en RPMI 1640 complementado con FBS al 10%, L-Glutamina al 1% y penicilina/estreptomycin al 1% a una densidad de 2×10^5 to 1×10^6 células viables/ml.

9.2) Anticuerpos y fragmentos de los mismos seleccionados para análisis funcional

Los anticuerpos y fragmentos de los mismos se generaron mediante presentación en fagos. La colección de fagémidos utilizada se basa en el concepto HuCAL® (Knappik, A. et al. (2000) J Mol Biol 296, 57-86) y emplea la tecnología CysDisplayTM para presentar el Fab en la superficie del fago (documento WO 01/05950) . Para aumentar la afinidad y la actividad biológica de fragmentos de anticuerpos seleccionados, las regiones L-CDR3 y H-CDR2 se optimizaron en paralelo mediante mutagénesis en casete utilizando mutagénesis dirigida por trinucleótidos (Virnekas, B et al. (1994) Nucleic Acids Res 22, 5600-5607), mientras que las regiones de marco se mantuvieron constantes. Se seleccionaron anticuerpos de diferentes marcos parentales para la conversión de IgG y la caracterización funcional. Estos anticuerpos y sus fragmentos se muestran en la Tabla 1A que figura a continuación.

Tabla 1 A: IgG y Fabs seleccionados para análisis funcional

	Marco
MOR08776	VL1/VH4
MOR10497	VL1/VH4

	Marco
MOR10501	VL1/VH4
MOR10502	VL1/VH4
MOR8775	VL1/VH1
MOR9441	VL1/VH1
MOR9464	VL1/VH1
MOR9465	VL1/VH1
MOR9466	VL1/VH1
MOR10579	VL1/VH1
MOR10222	VL1/VH1
MOR13363	VK1/VH3
MOR13361	VK1/VH3
MOR13341	VK1/VH1
MOR13342	VK1/VH1
MOR13347	VK1/VH1

El anticuerpo MOR9464 cuando se formula en una formulación líquida parece perder potencia con el tiempo. Se planteó la hipótesis de que la molécula puede sufrir algunas modificaciones que afectaron su potencia. MOR9464 se incubó a una temperatura superior a la temperatura fisiológica para acelerar la aparición de la pérdida de potencia. Al combinar técnicas biofísicas complejas, que incluyen espectrometría de masas y HPLC de fase inversa, se aislaron dos formas distintas, pero desconocidas, de MOR9464.

Puede producirse un cierto número de modificaciones en las proteínas cuando se encuentran en los medios extracelulares, durante la manipulación *in vitro* y la circulación *in vivo*. Cualquiera que sea la modificación, puede afectar ampliamente a las propiedades relevantes para los productos farmacéuticos basados en proteínas. Por lo tanto, se vuelve primordial entender la relación estructura-función de estas modificaciones. Las modificaciones exocelulares son modificaciones que se producen poco después de que las proteínas terapéuticas completan la vía de tráfico, alcancen la superficie celular y se liberan en el medio extracelular y se incuban allí durante el período de producción. También abarcan modificaciones que se producen durante la manipulación *in vitro*, tal como la purificación y la formulación en tampones adecuados, o incluso la circulación *in vivo* (Zhong X. y Wright J.F., Int J of Cell Biol., 2013, 1-19). El procesamiento proteolítico es la modificación exocelular más común y conocida, ya que sus productos se identifican fácilmente. La oxidación de residuos de aminoácidos individuales puede ser más difícil de caracterizar y puede implicar residuos de metionina, así como residuos de triptófano, cisteína, histidina y tirosina. La formación de piroglutamato N-terminal también es una modificación exocelular bien conocida, por la cual los residuos de glutamina o glutamato N-terminales pueden ciclar fácilmente con su propio grupo terminal para formar ácido pirrolidona carboxílico. También se conocen la desamidación de asparagina y residuos de aspartato o la isomerización de aspartato, aunque no modificaciones bien caracterizadas.

Si las modificaciones exocelulares se producen en regiones específicas del anticuerpo, pueden tener un efecto profundo en las características funcionales de un anticuerpo, tal como la pérdida de potencia. Si la modificación se produce en la CDR o en una ubicación muy cercana, puede afectar la capacidad del anticuerpo de reconocer y/o unirse específicamente a su antígeno.

Se llevaron a cabo análisis de la secuencia MOR9464 para identificar el sitio potencial de modificaciones exocelulares. Se generaron los mutantes que se muestran en la Tabla 1B.

Tabla 2B: Mutantes MOR9464/MOR10222

MOR9464_N30T
MOR9464_N30A
MOR9464_N30E
MOR9464_N30H
MOR9464_N30K
MOR9464_N30Q
MOR9464_N30G
MOR9464_N30V
MOR9464_N30Y

MOR9464_N30R
MOR9464_N30I
MOR9464_N30L
MOR9464_N30S
MOR10222_E1Q
MOR10222_E1Q_N30S
MOR10222_E1Q_N30D
MOR10222_E1Q_N30T
MOR10222_E1Q_N30S_M54Y
MOR10222_E1Q_N30S_M54N
MOR10222_E1Q_N30S_M54I (indicado en lo que sigue como MOR10222_N30S_M54I)
MOR10222_E1Q_S31T
MOR10222_E1Q_S31N
MOR10222_E1Q_S31A
MOR10222_E1Q_S31T_M54Y
MOR10222_E1Q_S31T_M54N
MOR10222_E1Q_S31T_M54I
MOR10222_E1Q_S31N_M54Y
MOR10222_E1Q_S31N_M54N
MOR10222_E1Q_S31N_M54I

La asparagina 30 que flanquea la H-CDR1 de MOR9464 se consideró un posible sitio de modificación, junto con serina 31 en la H-CDR1 y metionina 54 en la H-CDR2. La desamidación no enzimática de los residuos de asparagina y glutamina para aspartato y glutamato se produce a través de una reacción hidrolítica y depende del pH, la temperatura y la fuerza iónica. También depende de los residuos de aminoácidos que preceden a los residuos de asparagina y glutamina, aumentando serina y treonina las tasas de desamidación.

La mayoría de los mutantes MOR10222_S31X, con o sin mutación de metionina, se agregan fuertemente después de la producción. Por lo tanto, estos mutantes no se caracterizaron más.

9.3) Determinación de Afinidades Utilizando la Titulación de Equilibrio en Solución (SET)

Para la determinación de K_D por titulación de equilibrio en solución (SET), se utilizaron fracciones monoméricas de anticuerpos (analizadas por SEC analítica).

La determinación de la afinidad en solución se realizó básicamente tal como se describe en la bibliografía (Friguet B et al. (1985) J Immunol Methods;77(2):305-19). Con el fin de mejorar la sensibilidad y la precisión del método SET, se transfirió del ELISA clásico a la tecnología basada en electroquimioluminiscencia (ECL) (Haenel C et al. (2005) Anal Biochem;339(1):182-4.).

Anticuerpos específicos para el fragmento (Fab)₂ anti-humano de cabra (Dianova) se marcaron con MSD SULFO-TAG™ NHS-Ester (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se llevaron a cabo experimentos en placas de microtitulación de polipropileno y tampón de ensayo a base de fosfato. IL-18 humana no marcada se diluyó en serie, empezando con una concentración de al menos 10 veces más alto que la K_D esperada. Se utilizaron pocillos sin antígeno para determinar los valores de $B_{máx}$; se utilizaron pocillos con tampón de ensayo para determinar el fondo. Después de la adición de una cantidad constante de anticuerpos o fragmento de los mismos (p. ej., concentración final de 10 pM en 60 µl de volumen final), la mezcla se incubó durante

la noche a TA. La concentración de los anticuerpos o fragmentos de los mismos empelada fue similar o inferior a la K_D esperada .

Las placas de estreptavidina MSD se bloquearon durante la noche con tampón fosfato que contenía BSA. Después del bloqueo de la placa, se añadió IL-18 humana biotinilada y se incubó durante 1 h a TA. Posteriormente, las muestras equilibradas se transfirieron a esas placas y se incubaron durante un corto tiempo a TA. Después del lavado, se añadió anticuerpo de detección marcado con MSD SULFO-TAG ((Fab)₂) anti-humano de cabra a la placa de MSD y se incubó durante un corto tiempo a TA.

Después de lavar la placa y añadir MSD Read Buffer T con surfactante, se detectaron señales de electroquimioluminiscencia utilizando un aparato formador de imágenes Sector 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, EE.UU.).

Los datos se evaluaron con el software XLfit (IDBS) aplicando modelos de ajuste personalizados. Para la determinación de la K_D de las moléculas Fab se utilizó el siguiente modelo de ajuste (de acuerdo con Haenel et al., 2005) , modificado de acuerdo con Abraham et al, 1996):

$$y = B_{\max} - \left(\frac{B_{\max}}{2[Fab]_i} \left([Fab]_i + x + K_D - \sqrt{([Fab]_i + x + K_D)^2 - 4x[Fab]_i} \right) \right)$$

[Fab]_i: concentración total de Fab aplicada
x: concentración total de antígeno soluble aplicado (sitios de unión)
B_{máx}: señal máxima de Fab sin antígeno
K_D: afinidad

En principio, se aplicó el mismo protocolo para determinar los valores de K_D para anticuerpos y fragmentos con las siguientes diferencias: se añadieron anticuerpos completos a la serie de dilución de antígeno y se equilibraron durante la noche a TA. Posteriormente, las muestras fueron tratadas como se describe arriba.

Para la evaluación de los datos, es decir, la determinación de K_D de las moléculas de IgG, se utilizó el siguiente modelo de ajuste para IgG (modificado de acuerdo con Piehler et al., 1997):

$$y = \frac{2B_{\max}}{[IgG]} \left(\frac{[IgG]}{2} - \frac{\left(\frac{x + [IgG] + K_D}{2} - \sqrt{\frac{(x + [IgG] + K_D)^2}{4} - x[IgG]} \right)^2}{2[IgG]} \right)$$

[IgG]: concentración total de IgG aplicada
x: concentración total de antígeno soluble aplicado (sitios de unión)
B_{máx}: máxima señal de IgG sin antígeno
K_D: afinidad

Las afinidades de los anticuerpos anti-IL-18 o fragmentos de los mismos se determinaron en solución utilizando las condiciones de ensayo arriba descritas y se indican en la Tabla 2A (columna 2). En los casos en los que se testó también IL-18 de mono cynomolgus (cm IL-18), las K_D resultantes se indican entre paréntesis.

9.4) Inhibición de la liberación de IFN-γ de PBMC humanas estimuladas con IL-18

Células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) se aislaron recientemente de sangre entera humana heparinizada utilizando técnicas estándares. Brevemente, la sangre diluida que contiene heparina (15 U/ml) como anticoagulante se colocó en capas en Ficoll-Paque™ Plus y se centrifugó (800xg, 20 minutos, 18°C). Las PBMC se recogieron de la interfaz Ficoll del plasma y se lavaron dos veces (600xg, 10 minutos, 4°C), antes de volver a suspenderlas en medio.

Las PBMC se volvieron a suspender en medios y se aplicaron a una placa de cultivo celular de 96 pocillos para dar una densidad final de células de 1,5x10⁶/ml (en un volumen de ensayo final de 200 μl). Para asegurar que los anticuerpos y fragmentos de los mismos de acuerdo con la invención reconocieran IL-18 nativa, que puede estar glicosilada, se estimularon PBMC con LPS e IL-12 que induce IFN-γ a través retroalimentación autocrina dependiente de IL-18.

Las células se estimularon con IL-18 recombinante humana 3 nM más IL-12 (1 ng/ml) o LPS (3 µg/ml) más IL-12 (10 ng/ml) para inducir la secreción de proteína IL-18 nativa (todas las concentraciones finales). En el caso de IL-18 humana recombinante, la concentración seleccionada se predeterminó como una CE_{80} aproximada en este ensayo. En el caso de IL-18 nativa, LPS estimula la producción de IL-18, mientras que IL-12 aumenta la expresión del receptor de IL-18 (Yoshimoto T et al. (1998) J Immunol; 161(7):3400-7). El grado de dependencia de IL-18 en este ensayo se determinó mediante la inclusión de la proteína altamente específica, Proteína de Unión-IgG₁ Fc a IL-18 (hIL-18BP_a-Fc) como control positivo (línea de puntos en las Figuras 3 (A-D)).

Para evaluar su potencia y eficacia, los anticuerpos y fragmentos de los mismos se pre-equilibraron durante 30 min con IL-12 y LPS (condiciones nativas) o IL-12 e IL-18 (condiciones recombinantes) antes de aplicar a células con una concentración final entre 0,1 y 300 nM. Se utilizó el anticuerpo de control anti-lisozima MOR03207 como un control negativo.

De cada uno de los grupos de tratamiento, se determinó un valor media $\pm$ EMT (en que $n = 3$ o más) a partir de $n = 2-5$ pocillos.

Las células se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ durante 24 horas después del tratamiento, después de lo cual el sobrenadante se recogió por centrifugación (1200 rpm durante 5 min) y se almacenó a -20°C para su posterior análisis. Los niveles de proteína IFN- γ se evaluaron utilizando ELISA según las instrucciones del fabricante.

Todos los anticuerpos y fragmentos de los mismos inhibieron de forma dependiente de la dosis la producción de IFN- γ con un nivel similar de eficacia alcanzado a las concentraciones más altas como la observada para IL-18BP_a-Fc recombinante (Tabla 2A columnas 5-6, Tabla 2B columna 2 y Figuras 3 (A-D), en que la eficacia de IL-18BP_a se designa por la línea de puntos). El anticuerpo de control, MOR03207 (anticuerpo de control anti-lisozima) no inhibió la respuesta de IL-18. Los anticuerpos germinativos (p. ej., MOR10579 de MOR09441 y MOR10222) de MOR09464 no alteraron significativamente su capacidad neutralizante. Los mutantes de MOR9464 y MOR10222, en particular MOR9464_N30K y MOR10222_N30S_M54I tenían una capacidad neutralizante equiparable a los anticuerpos de tipo salvaje.

Tabla 2A: Valores K_D de afinidad de IL-18 y valores CI_{50} (nM) para la inhibición de IL-18 recombinante humana (hr) (1 nM) y liberación de IFN γ inducida por IL-18 nativa

	K_D (SET, pM) Hu IL-18	KG-1 Hu IL-18	KG-1 Cyno IL-18	PBMC Hu IL-18	PBMC IL-18 nativa
MOR08776	38	18	ND	50,8	5,9
MOR010497	2	0,3	0,3	5,8 $\pm$ 2,2	1,8 $\pm$ 0,6
MOR010501	1	0,3	0,2	6,3 $\pm$ 1,5	1,3 $\pm$ 0,5
MOR010502	4	0,4	0,2	6,3 $\pm$ 0,7	2,3 $\pm$ 1,1
MOR08775	65	68	22	9,2	0,7
MOR09465	6	0,3	1,8	0,6	0,89 $\pm$ 0,3
MOR09466	5	0,4	5,6	1,2	2,1 $\pm$ 0,6
MOR09441	1	0,6 $\pm$ 0,1	16,4 $\pm$ 7,1	2,5 $\pm$ 1,0	0,45 $\pm$ 0,1
MOR09464	3	0,8 $\pm$ 0,2	8,3 $\pm$ 1,6	1,3 $\pm$ 0,5	0,2 $\pm$ 0,03
MOR010579	N/D	0,8 $\pm$ 0,2	9,8 $\pm$ 5,3	1,9 $\pm$ 0,6	0,3 $\pm$ 0,02
MOR010222	N/D	0,7 $\pm$ 0,1	6,6 $\pm$ 2,0	2,3 $\pm$ 0,5	0,22 $\pm$ 0,03
IL-18BP-Fc	N/D	0,3 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,5	0,17 $\pm$ 0,02
MOR09464_N30K	2 $\pm$ 1 (20 $\pm$ 10)	0,36 $\pm$ 0,15	4,7		0,2 $\pm$ 0,14
MOR1022_N30S_M54I	3 $\pm$ 2 (30 $\pm$ 0)	4,21 $\pm$ 0,14	8,12		0,05 $\pm$ 0,03
MOR13363	10 $\pm$ 0 (10 $\pm$ 0)	0,49 $\pm$ 0,9*	0,28 $\pm$ 0,16 [#]		0,18 $\pm$ 0,1
MOR13361	7 $\pm$ 3 (6 $\pm$ 1)	0,41*	0,13 [#]		0,5 $\pm$ 0,01
MOR13341	3 $\pm$ 2 (30 $\pm$ 0)	0,13 $\pm$ 0,08*	2,8 $\pm$ 0,26 [#]		0,8 $\pm$ 0,7
MOR13342	N/D	0,11 $\pm$ 0,03*	2,9 [#]		0,5 $\pm$ 0,4
MOR13347	N/D	0,12 $\pm$ 0,07*	2,8 $\pm$ 0,3 [#]		0,5 $\pm$ 0,4

N/D = no disponible; *concentración de IL-18 humana = [0,5 nM]; [#] concentración de IL-18 de cyno = [0,2 nM]

Tabla 2B: Valores CI_{50} (nM) para la inhibición de IL-18 recombinante humana (hr) (1 nM) y liberación de IFN γ inducida por IL-18 nativa

Identificación	KG-1 Hu IL-18	PBMC IL-18 nativa
MOR1022_N30S	3,3 $\pm$ 2,1	0,05 $\pm$ 0,00
MOR1022_N30S_M54Y	4,8 $\pm$ 0,3	0,09 $\pm$ 0,01
MOR1022_N30S_M54N	5,2 $\pm$ 4,4	0,03 $\pm$ 0,02
MOR1022_N30S_M54I	4,2 $\pm$ 1,4	0,05 $\pm$ 0,03*
MOR09464_N30T	0,31 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,09
MOR09464_N30E	0,49 $\pm$ 0,05	0,13 $\pm$ 0,05
MOR09464_N30H	0,23 $\pm$ 0,11	0,10 $\pm$ 0,05
MOR09464_N30K	0,36 $\pm$ 0,15	0,20 $\pm$ 0,14
MOR09464_N30Q	0,22 $\pm$ 0,03	0,07 $\pm$ 0,14
MOR09464_N30G	0,54 $\pm$ 0,06	0,11 $\pm$ 0,07
MOR09464_N30V	0,29 $\pm$ 0,03	0,11 $\pm$ 0,02
MOR09464_N30Y	0,23 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01
MOR09464_N30R	0,47 $\pm$ 0,49	0,04 $\pm$ 0,01
MOR09464_N30I	0,32 $\pm$ 0,09	0,11 $\pm$ 0,06
MOR09464_N30L	0,23 $\pm$ 0,03	0,05 $\pm$ 0,04

(n=2; Media +/- DE)

n=3; Media +/- EMT

*n=2; Media +/- DE

5 9.5) Inhibición de la liberación de IFN- γ de células KG-1 estimuladas con IL-18

Anticuerpos anti-IL-18 y fragmentos de los mismos se analizaron en cuanto a su capacidad de inhibir la liberación de IFN - γ a partir de células KG-1 estimuladas con IL-18. En ausencia de un antagonista, IL-18 fomenta la máxima estimulación de la liberación de IFN - γ en presencia de un co-estímulo, tal como TNF α e IL-12 a través de la regulación al alza de receptores de IL-18 (Nakamura S et al. (2000) Leukemia; 14(6):1052-9). La actividad inhibidora de los anticuerpos y fragmentos se evaluó frente a 1 nM de IL-18 humana o de cynomolgus (a menos que se especifique lo contrario), predeterminada como una CE_{80} en este sistema basado en células.

Células KG-1 se volvieron a suspender en medios de cultivo y se aplicaron a una placa de cultivo celular de 96 pocillos para dar una densidad final de células de $0,3 \times 10^6$ /ml (en un volumen de ensayo final de 200 μ l). Las células fueron estimuladas con IL-18 recombinante humana o de cynomolgus 1 nM más TNF α (concentración final 20 ng/ml). La concentración de IL-18 recombinante seleccionada se predeterminó como una CE_{80} aproximada en este ensayo.

Para evaluar la potencia y eficacia de estos anticuerpos, los anticuerpos y fragmentos de los mismos se pre-equilibraron durante 30 min con TNF α e IL-18 (humanas o de cynomolgus) antes de aplicar a células con una concentración final entre 0,1 y 300 nM. Se utilizó el anticuerpo de control anti-lisozima MOR03207 como un control negativo.

De cada uno de los grupos de tratamiento, se determinó un valor medio $\pm$ EMT a partir de $n = 2-5$ pocillos.

Las células se incubaron a 37°C, 5% de CO $_2$ durante 24 horas después del tratamiento, tiempo después del cual el sobrenadante se recogió por centrifugación (885 x g durante 5 min) y se almacenó a -20°C para su posterior análisis. Los niveles de proteína IFN - γ se evaluaron utilizando ELISA según las instrucciones del fabricante.

Todos los anticuerpos y fragmentos de los mismos inhibieron la producción de IFN- γ de forma dependiente de la dosis con una inhibición completa lograda a las concentraciones más altas. Para los anticuerpos madurados para afinidad, los valores de CI_{50} oscilaron entre 0,3-0,8 nM frente a 0,8 nM de IL-18 humana, por lo tanto representa una relación molar 1:1 de anticuerpo:antígeno o mejor. Los anticuerpos marco VH4_3b (MOR08776, MOR010501, MOR010502) demostraron una potencia similar contra IL-18 humana y de cynomolgus, mientras que los anticuerpos marco VH1A_3 fueron ligeramente menos potentes contra IL-18 de cynomolgus (Tabla 2, columnas 3 y 4). El anticuerpo de control, MOR03207 no inhibió la respuesta de IL-18.

9.6) Liberación de INF- γ inducida por IL-18 en sangre entera humana

El análisis de sangre entera incorpora tanto la presencia como la función de la IL-18BP endógena, ya que la IL-18BP es generada principalmente por el bazo y está presente sistémicamente a niveles de alrededor de 10-20 ng/ml en individuos sanos. IL-18BP se une con alta afinidad a IL-18 y neutraliza su actividad y, por lo tanto, podría representar un sumidero de anticuerpos que reconocen epítomos accesibles de este complejo.

La actividad de los anticuerpos anti-IL-18 se evaluó en sangre entera humana heparinizada tomada de un voluntario sano. Todos los reactivos se prepararon a veinte veces la concentración final deseada utilizando medio libre de suero. Las células se estimularon con IL-18 recombinante humana 7 nM más IL-12 (1 ng/mL) o LPS (10 μ g/mL) más IL-12 (10 ng/mL) para inducir la secreción de proteína IL-18 nativa (todas concentraciones finales). En el caso de IL-18 humana recombinante, la concentración seleccionada se predeterminó como una CE_{80} aproximada en este ensayo. En el caso de la IL-18 nativa, LPS estimula la producción de IL-18, mientras que IL-12 aumenta la expresión del receptor de IL-18 y el grado de dependencia de IL-18 se determina mediante la inclusión de Proteína de Unión-IgG₁ Fc a IL-18 (hIL-18BP α -Fc) como control positivo.

Para evaluar la potencia y eficacia de estos anticuerpos, los anticuerpos anti-IL-18 y fragmentos de los mismos se pre-equilibraron durante 30 min con el estímulo relevante antes de aplicar a células con una concentración final entre 0,1 y 1000 nM. Se utilizó el anticuerpo de control anti-lisozima MOR03207 como un control negativo.

La mezcla de estímulos (+/- anticuerpo o fragmento) se añadió a cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación estéril de cultivo de tejidos de 96 pocillos a medida que se añadieron 30 μ L y 170 μ L de sangre entera heparinizada a cada uno de los pocillos, de modo que el volumen final en cada uno de los pocillos fue de 200 μ L. Las placas fueron devueltas a una incubadora humidificada (37°C). Después de 24 h, se centrifugaron las placas (885 x g, 4°C, 5 min) y los sobrenadantes se retiraron y se analizaron en cuanto a la producción de hIFN- γ utilizando un kit de ELISA comercialmente disponible. Los datos finales se obtuvieron como una media $\pm$ error típico de la media de 3-5 donantes humanos sanos.

Todos los anticuerpos y fragmentos inhibieron la producción de IFN γ dependiente de la dosis contra cualquiera de los estímulos. La inhibición completa de la respuesta inducida por IL-18 recombinante se logró a las más concentraciones, mientras que se observó una eficacia similar contra la estimulación con LPS /IL-12 que la de IL-18BP α -Fc (Tabla 3; Figuras 7(A-E) y 8(A-E)). La germinación de MOR09441 y MOR09464 no alteró significativamente su capacidad neutralizante. El anticuerpo de control, MOR03207 no inhibió la respuesta de IL-18. Los anticuerpos seleccionados también se evaluaron en cuanto a su capacidad para inhibir la bioactividad de IL-18 de cynomolgus recombinante (7 nM) en sangre entera del mono cynomolgus. MOR09441, MOR09464, MOR09465, MOR09466 todos inhibieron de forma dependiente de la dosis la producción de IFN- γ con plena inhibición observada en las concentraciones más altas. Los valores CI_{50} observados fueron 110 $\pm$ 36nM, 51 $\pm$ 8nM, 55 $\pm$ 3 nM, 179 $\pm$ 30 nM, respectivamente.

Tabla 3: Valores de CI_{50} (nM) para la inhibición de la liberación de IFN- γ inducida por IL-18 en la sangre entera

Identificación	Sangre entera humana estimulada con IL-18 humana recombinante (7 nM)	Sangre entera humana estimulada con LPS/IL-12
MOR010497	16,1 $\pm$ 6,6	107,9 $\pm$ 8,3
MOR010501	20,3 $\pm$ 5,6	101,3 $\pm$ 44
MOR010502	17,9 $\pm$ 5,0	110,4
MOR09465	4,2 $\pm$ 1,0	19,4 $\pm$ 7,8
MOR09466	5,6 $\pm$ 0,5	18,5 $\pm$ 1,6
MOR09441	8 $\pm$ 2,1	16,3 $\pm$ 5,4
MOR09464	3,6 $\pm$ 0,4	9,8 $\pm$ 3,2
MOR010579	5,6 $\pm$ 1,4	16,7 $\pm$ 7,0
MOR010222	4,7 $\pm$ 1,5	21,6 $\pm$ 9,9
IL-18BP-Fc	5,7 $\pm$ 2,0	12,1 $\pm$ 6,2
MOR13363	29,4	91,7 $\pm$ 66,9
MOR13361	15,72 $\pm$ 5,5	39,4 $\pm$ 13,5

Identificación	Sangre entera humana estimulada con IL-18 humana recombinante (7 nM)	Sangre entera humana estimulada con LPS/IL-12
MOR13341	5,6±0,4	19,6±5,3
MOR13342	6,6±1,0	21,5±6,7
MOR13347	3,5	8,3
MOR1022_N30S	58,4 ± 14,4	16,9 ± 7,4
MOR1022_N30S_M54Y	34,3 ± 16,6	18,8 ± 6,5
MOR1022_N30S_M54N	46,5 ± 9,9	16,1 ± 5,1
MOR1022_N30S_M54I	47,3 ± 15,1	9,3 ± 4,4
MOR09464_N30T	12,46 ± 2,67	20,76 ± 5,74
MOR09464_N30E	12,88 ± 2,79	19,16 ± 6,67
MOR09464_N30H	11,93 ± 2,14	22,98 ± 11,04
MOR09464_N30K	8,62 ± 2,62	17,09 ± 3,64
MOR09464_N30Q	8,10 ± 1,00	13,40 ± 2,91
MOR09464_N30G	25,14 ± 5,26	15,07 ± 2,80
MOR09464_N30V	12,68 ± 1,86	19,60 ± 4,90
MOR09464_N30Y	12,39 ± 1,59	17,85 ± 5,12
MOR09464_N30R	10,07 ± 1,32	11,03 ± 1,26
MOR09464_N30I	11,42 ± 2,37	13,15 ± 4,53
MOR09464_N30L	9,85 ± 1,64	15,46 ± 2,29
	n=3-4; Media +/- EMT	n=3-4; Media +/- EMT *n=2; Media +/- DE

Los mutantes de MOR9464 y MOR10222, en particular MOR9464_N30K y MOR10222_N30S_M54I tenían una capacidad neutralizante equiparable a los anticuerpos de tipo salvaje.

5 9.7) Unión por ELISA de Anticuerpos anti-IL-18 al Complejo IL-18-IL-18BP

Para confirmar que los anticuerpos anti-IL18 o sus fragmentos descritos en esta memoria no reconocen IL-18 unida al IL-18BP (complejo IL-18/IL-18BP), IL-18 se incubó con IL-18BP (rhIL-18BP/Fc, R&D Systems, nº Cat 119) en un exceso molar. Se añadieron anticuerpos y fragmentos anti-IL18 tal como se describe más adelante y se detectó la unión al complejo. En general, se detectan señales a altas concentraciones de los anticuerpos y fragmentos anti-IL-18 en que se unen a epítomos accesibles en el antígeno diferente al IL-18BP (es decir, reconocen el complejo IL-18/IL-18BP). En una primera configuración, los anticuerpos de control y los anticuerpos y fragmentos anti-IL18 se diluyeron utilizando PBST/BSA al 0,5% y se añadieron al complejo IL-18/IL18-BP biotinilado (incubación en placas de polipropileno durante 30 min a TA y agitación suave). Los anticuerpos de control fueron MOR03207 (anti-lisozima) como control negativo, MOR08741, así como 125-2H de ratón, una IgG de ratón IL-18 anti-humana, como anticuerpos de control positivo (ambos reconocen el complejo IL-18/IL-18BP) (Argiriadi MA et al. (2009) J Biol Chem; 284(36):24478-89). Todo el complejo se capturó a través de los restos de biotina en placas de NeutrAvidina, que se bloquearon o/n con 1x ChemiBlocker-PBS.

Las placas se lavaron 5 veces con PBST y se incubaron durante 1 h con 20 µl/pocillo de anticuerpo de detección anti-Fab-AP - IgG anti-humana de cabra, fragmento F(ab)2 específico (Jackson Immuno Research, 109-055-097, lote: 69655) o IgG anti-ratón (molécula completa)-AP (SIGMA, nº A4312) ambos diluidos 1:5000 en BSA al 0,5%/Tween20 al 0,05%/1x PBS. Las placas se lavaron 5 veces con TBST, se añadieron 20 µl de solución AttoPhos (Roche) (1:5 diluido en ddH2O) y se midió la fluorescencia en el lector Tecan.

Para los anticuerpos anti-IL-18 MOR8775 y MOR8776 que no se unen al complejo IL-18/IL-18BP, las señales de unión disminuyeron significativamente o no se observaron señales (Figura 9(A)). En comparación, se observó una fuerte señal en presencia de 125-2H de ratón que respalda la capacidad informada de este anticuerpo de control para unirse

a un epítipo distinto del de la IL-18BP. De manera similar, se observó una señal dependiente de la dosis en presencia del anticuerpo de control MOR08741.

En una segunda configuración, el experimento se realizó de manera similar, excepto por el uso de IL-18 hu no biotinilada. El complejo IL-18/IL-18BP se capturó en una placa Maxisorp a través de la etiqueta Fc de rhIL-18BP/Fc utilizando una IgG anti-hu de cabra (fragmento Fc gamma específico, Jackson ImmunoResearch nº 109-005-098). Se observó una señal dependiente de la concentración para los controles MOR08741, destacando nuevamente la capacidad de este anticuerpo de reconocer el complejo IL-18/IL-18BP. En comparación, no se observó señal para MOR09441, MOR09464, MOR09465, MOR09466, lo que confirma que no se unen al complejo IL-18/IL-18BP.

9.8) Agrupación de epítipos de anticuerpos anti-IL18 y fragmentos mediante ELISA

Para la agrupación de epítipos se utilizaron dos configuraciones. Para la primera configuración, se tituló un fragmento de anticuerpo (Fab A) y se incubó con IL-18 humana biotinilada. El Fab A se testó con una concentración constante de un anticuerpo B (IgG B). Como control positivo, Fab A se analizó consigo mismo en el formato IgG. Las placas de NeutrAvidina (Thermo Scientific nº Cat 15402) se bloquearon con Chemiblocker (1:1 diluido con PBS) y se incubaron durante 2 h a TA (o durante la noche a 4°C). Al día siguiente, las placas se lavaron 2 veces con PBST y las Fab se titularon desde 500 nM hasta 2 nM en tampón PBS que contenía IL-18 humana biotinilada de concentración final 10 nM. El complejo de fragmentos de anticuerpos e IL-18 biotinilada se añadió a las placas de NeutrAvidina y se incubó durante 1 hora. Después de lavar 3 veces con PBST, se añadió IgG B a 20 nM a los pocillos correspondientes de las placas de NeutrAvidina. Después de 20 minutos de incubación, y lavado 3 veces con PBST, anticuerpos de detección anti-Fc-AP- IgG anti-humano de cabra, específico de cadena Fc gamma (Jackson Immuno Research, 109-055-098) e IgG anti-ratón (molécula completa) -AP (SIGMA, nº A4312, Lote: 067K4863) se añadieron diluidos 1: 5000 en BSA al 0,5% /Tween20 al 0,05%/1x PBS.

Las placas se lavaron 5 veces con PBST, se añadieron 20 µl de solución AttoPhos (1:5 diluida en ddH₂O) y las placas se midieron en el lector Tecan. La emisión de fluorescencia a 535 nm se registró con excitación a 430 nm.

En general, las señales solo podían obtenerse cuando la IgG B podía unirse a epítipos accesibles en el antígeno que son diferentes al Fab A testado (es decir, la unión del anticuerpo a un epítipo diferente). En contraposición, para los anticuerpos con epítipos parcialmente superpuestos o idénticos, las señales de unión disminuyeron significativamente en comparación con los controles.

La segunda configuración ELISA se realizó en placas Maxisorp. Fab A se revistió a diferentes concentraciones en PBS y se incubó durante la noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se lavaron 3 veces con PBST y se bloquearon durante 2 horas a TA con MPBST al 5% (100 µl/pocillo). Después de una etapa de lavado 3 veces con PBST, se añadió IL-18 humana a una concentración constante durante 1 h. Las placas se lavaron 3 veces con PBST y se tituló el fragmento de anticuerpo biotinilado (Fab B biotinilado) (conc. máx. 5 µg/mL, 10 µg/mL o 20 µg/mL). Para la formación del complejo de Fab A con IL-18 y Fab B biotinilado, las placas se incubaron durante 1 h, posteriormente se lavaron 3 veces con PBST y se diluyó el anticuerpo de detección de Estreptavidina-Fosfatasa Alcalina ZyMax (Zymed, nº Cat. 43-8322, Lote 51102099) 1: 2.000 en PBST y se añadieron 20 µL/pocillo a las placas ELISA. Las placas se lavaron 5 veces con TBST, se añadieron 20 µL de solución AttoPhos (Roche) (1:5 diluida en ddH₂O) y las placas se midieron en el lector Tecan.

En este caso, en cuanto a la primera configuración, las señales solo se podían obtener cuando el Fab B biotinilado era capaz de unirse a epítipos accesibles en el antígeno que son diferentes al Fab A testado (es decir, el anticuerpo se une a un epítipo diferente).

Tal como se muestra en la Figura 10A, anticuerpos MOR8775 compiten con el anticuerpo murino 125-2H (relleno de células en negro), mientras que MOR8776 no compete con 125-2H para unirse a IL-18 (sin relleno de células). Ambos anticuerpos compiten con IL-18BP-Fc para unirse a IL-18 (reellenos de células en negro). Ni MOR8775 ni MOR8776 compiten con el anticuerpo ABT325 (solicitudes de patente de EE.UU. Nº de serie 09/780.035 y 10/988.360). Dependiendo de las configuraciones de los experimentos, MOR8775 y MOR8776 compiten entre sí (relleno de celdas rayado).

En un segundo conjunto de experimentos, los anticuerpos MOR9464, MOR9464_N30K, MOR10222_N30S_M54I y MOR13341 se testaron para determinar su capacidad de unirse a IL-18 en presencia de cualquiera de estos anticuerpos, IL-18BP-Fc, ABT325 y el anticuerpo murino 125-2H utilizando el instrumento Proteon XPR36, un biosensor libre de etiqueta en tiempo real basado en resonancia de plasmón de la superficie (SPR). Antes del análisis, se confirmó la integridad de las proteínas y se evaluó la concentración mediante LC-MS.

Todos los anticuerpos e IL18BP-Fc se inmovilizaron en los puntos de interacción de un chip sensor GLC mediante acoplamiento de amina estándar. En una primera etapa, se inyectó IL18 como analito 1 y en una segunda etapa se inyectó un anticuerpo anti-IL18 o IL18BP-Fc como analito 2.

Los ligandos a inmovilizar se prepararon a una concentración de 20 µg/mL (anticuerpos) o 10 µg/mL (IL18BP-Fc) en tampón acetato 10 mM, pH 4,0. Los analitos se diluyeron en tampón PBS (TEKNOVA) que contenía Tween 20 al 0,005%, se utilizó la misma solución tampón que el tampón de desarrollo para el instrumento. El analito 1 (IL18 25 nM) se inyectó a un caudal de 50 µL/min durante 180 segundos con un tiempo de disociación de 60 segundos. El analito 2 (IL18BP-Fc o anticuerpo anti-IL18 25 nM) se inyectó a un caudal de 50 µL/min durante 180 segundos con un tiempo de disociación de 180 segundos. La regeneración se realizó con glicina 10 mM, pH 1,5 a un caudal de 100 µL/min durante 20 segundos. Se realizaron dos conjuntos independientes de experimentos. La evaluación de los datos se basó en si la señal del sensograma aumentó con la inyección del analito 2 en comparación con la señal del analito 1. Si la señal aumentó, se concluyó que el ligando inmovilizado y el analito 2 inyectado reconocían diferentes epítomos. Si la señal no aumentaba, se concluyó que los dos compartían los mismos epítomos o epítomos solapantes.

Como se muestra en la Figura 10B, los anticuerpos MOR9464, MOR9464_N30K, MOR10222_N30S_M54I y MOR13341 compiten entre sí (reellenos de células en negro), con IL-18BP-Fc y con el anticuerpo murino 125-2H. Ninguno de estos anticuerpos compete con ABT325 (reellenos de células en blanco).

Los anticuerpos como MOR9464_N30K y MOR10222_N30S_M54I que muestran una doble competencia con IL-18BP-Fc y con el anticuerpo murino 125-2H parecen tener la ventaja de no solo unirse a IL-18 libre, no unirse al inhibidor natural IL-18BP-Fc, sino también parecen tener el potencial de prevenir la unión de IL-18 a IL-18Rα/β. Como se describe en Wu et al. (Wu C. et al., J. Immunol. 2003, 170: 5571-5577), IL-18R β no parece unirse a IL-18 solo, sino que forma un complejo receptor funcional de alta afinidad con IL-18Rα que es capaz de señalizar en respuesta a IL-18. Los datos bioquímicos combinados con el mapeo de epítomos de 125-2H en IL-18 han revelado que los 17 aminoácidos C-terminales de la IL-18 humana son críticos para la transducción de señales a través del receptor heterodimérico. Por lo tanto, anticuerpos capaces de unirse dentro del epítomo 125-2H y competir igualmente con IL-18 BP por unirse a IL-18 parecen tener el potencial de prevenir la activación de la ruta dependiente de IL-18 no solo mediante el bloqueo de la unión a IL-18Rα, sino también mediante el bloqueo de la unión de IL-18 al complejo IL-18Rα/β. Como resultará evidente en la sección 9.11, el anticuerpo MOR9464_N30K se une, entre otros, a los aminoácidos Glu177 y Leu180 que están dentro del tramo de 17 aminoácidos descrito en Wu et al.

9.9) Mapeo del epítomo IL-18 por modelado

IL-18 humana de la entrada Q14116 de SwissProt se utilizó para buscar información estructural en el PDB (Berman H.M *et al* (2000) Nucl Acids Res; 28:235-242). Se encontraron tres estructuras con el código 1J0S (Kato Z *et al* (2003) Nat Struct Biol;10:966), 2VXT (Argiriadi MA *et al* (2009) J Biol Chem; 284:24478) y 3F62 (Krumm B *et al* (2008) Proc Natl Acad Sci USA; 105:20711). 1J0S es la estructura de RMN de la IL-18 humana. 2VXT es la estructura cristalina de la IL-18 humana modificada en complejo con el fragmento de anticuerpo 125-2H de ratón a una resolución de 1,49 Å, y 3F62 es la estructura cristalina de la IL-18 humana modificada en complejo con la proteína de unión a IL-18 de poxvirus a una resolución de 2,0 Å.

Se han identificado tres sitios de unión en IL-18 mediante análisis mutacional. Dos de ellos, el sitio 1 y el 2, son importantes para unir IL-18Rα y el tercero, el sitio 3, para unir IL-18Rβ (Kato Z. et al. (2003) Nat.Struct.Biol, 10:966). El sitio 2 también es importante para la unión de IL-18BP.

También está disponible un complejo estructural entre IL-1β e IL-1R1 (1ITB, Vigers G.P. et al (1997) Nature, 386:190). La estructura del complejo entre IL-1β e IL-1R1 demuestra que IL-1β tiene dos sitios de unión para el receptor, los sitios 1 y 2 (Figura 11(A)). Ya que no hay estructura disponible para el complejo entre IL-18 e IL-18Rα, se utilizó la estructura cristalina de IL-1β en complejo con IL-1R1 como molde para el modelado de proteínas (código PDB 1ITB). El modelo de IL-18Rα se construyó utilizando la estructura de IL-1R1 como molde. La estructura cristalina de IL-18 (código pdb 2VXT, Argiriadi M.A. et al (2009) J.Biol.Chem. 284:24478) y la estructura modelada de IL-18Rα se superpusieron estructuralmente al complejo IL-1β/IL-1R1 y el modelo α IL-18/IL-18Rα así obtenido se refinó para obtener el modelo estructural final (Figura 11(B)). MOE v2009.1 (Chemical Computing Group Inc.) es el software utilizado para modelar el complejo entre IL-18 e IL-18Rα. Se ha utilizado el panel Modelo de Homología para construir el modelo de IL-18Rα, seleccionando el campo de fuerza AMBER99 y los parámetros del panel por defecto. El panel de minimización de energía en MOE se ha utilizado para el refinamiento del complejo IL-18/IL-18Rα final.

La estructura general de la IL-18 humana muestra similitud con la de la IL-1β. En particular, la RMSD (desviación de la raíz cuadrática media) entre los átomos de IL-18 e IL-1β Cα en elementos de estructura secundaria indica que son proteínas relacionadas que pertenecen a la misma clase de estructura (Kato Z. et al. (2003) Nat.Struct. Biol, 10:966). Una comparación entre las estructuras de IL-1β e IL-18 reveló que los sitios 1 y 2 en IL-18 corresponden a los sitios 1 y 2 en IL-1β. En la Figura 11(B), los sitios 1 y 2 se muestran en el modelo del complejo entre IL-18 e IL-18Rα, también se muestra el sitio 3. El sitio 3 se reseña como el sitio de interacción para IL-18Rβ (Kato Z. et al. (2003) Nat.Struct.Biol, 10:966).

El sitio de unión de IL-18 para IL-18BP ha sido identificado de alguna manera por mutaciones de alanina y por la estructura cristalina de rayos X de IL-18BP de poxvirus en complejo con IL-18 (Krumm *et al* (2008) Proc Natl Acad Sci USA; 105(52):20711-20715). Este supuesto sitio de unión también corresponde a la región en IL-18 que se ha identificado como sitio 2, una de las dos regiones de interacción de IL-18 con IL-18Rα.

9.10) Mapeo del epítipo IL-18 por Espectrometría de Masas de intercambio de Hidrógeno/Deuterio (H/DxMS)

La Espectrometría de Masas de intercambio de Hidrógeno/Deuterio se utilizó para sondear IL-18 humana para obtener información sobre el epítipo para MOR9464. El mapeo de H/DxMS se basa en las diferencias de masa entre los átomos de hidrógeno "normales" y el deuterio isotópico "pesado" que también comprende un neutrón, además del protón único presente en el núcleo normal de hidrógeno.

Tras la transferencia de agua a un sistema de disolventes a base de deuterio (agua pesada), una proteína experimentará un incremento de la masa a medida que el hidrógeno de la amida en la cadena principal de la proteína se reemplaza gradualmente por deuterones (isótopo de hidrógeno más pesado). La probabilidad de un evento de intercambio de hidrógeno/deuterio está determinada en gran medida por la estructura de la proteína y la accesibilidad al disolvente. La tecnología H/DxMS se utiliza para medir el intercambio relativo de hidrógeno/deuterio y, como consecuencia, la estructura de la proteína y la accesibilidad al disolvente.

Cuando un participante de la unión a proteínas se une a un anticuerpo (p. ej., interacción antígeno/anticuerpo) pueden observarse cambios observables experimentalmente en su tasa de intercambio. Las regiones de la superficie que excluyen disolvente tras la formación del complejo se intercambian mucho más lentamente. Las regiones excluidas por disolvente son útiles para deducir la ubicación de un sitio de unión. En el caso de una interacción antígeno-anticuerpo, los cambios en la tasa de intercambio de deuterio pueden resaltar la ubicación del epítipo, pero también cualquier otra perturbación resultante de la unión del anticuerpo al antígeno. Por ejemplo, una disminución en la cantidad de absorción de deuterio en el antígeno en un tiempo de intercambio dado después de la unión del anticuerpo podría representar una protección incrementada debido a la unión directa del anticuerpo a esta región o una perturbación indirecta de la estructura (cambios alostéricos) debido a la unión del anticuerpo. Estos dos efectos no se pueden distinguir muy fácilmente, aunque el efecto más fuerte observado a menudo se atribuye a la protección directa del anticuerpo.

La ubicación de la incorporación de deuterón disminuida después de la unión del anticuerpo puede deducirse mediante la digestión de la proteína diana después del intercambio de hidrógeno/deuterio (p. ej., con una enzima adecuada tal como pepsina) y luego la espectrometría de masas para determinar la masa de los fragmentos relevantes.

Se llevaron a cabo experimentos de control por triplicado en 316 pmol de antígeno IL-18 a tiempos de intercambio de deuterio de 3 y 25 minutos diluyendo una solución de partida de IL-18 con tampón PBS deuterado al 95% a una concentración de 83,6% de D. El intercambio de deuterio se enfrió bruscamente con tampón de enfriamiento brusco (Urea 6 M y TCEP 1 M). Después del enfriamiento brusco, el vial se analizó mediante digestión en línea con pepsina / análisis LC-MS. La digestión de pepsina en línea se realizó utilizando pepsina inmovilizada Poroszyme de Life Science empaquetada en una columna de 2,0 x 20 mm, y la separación por LC se realizó en una columna Thermo C18 BioBasic (1,0 x 50 mm) a un caudal de 100 µL/min utilizando un gradiente rápido, de modo que todos los péptidos eluyeron en menos de 20 minutos. Las fases móviles son fases móviles estándares de fase inversa: Ácido fórmico al 0,1% en agua y ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo. En estos experimentos, los hidrógenos de la amida de la cadena principal que están expuestos en la superficie de IL-18 incorporarán deuterones.

A continuación, se llevaron a cabo experimentos de marcaje por triplicado. Primero, el anticuerpo MOR9464 se inmovilizó en perlas de agarosa Proteína G (Thermo 22851) utilizando técnicas estándares. Las perlas de anticuerpos se centrifugaron para separar una solución de PBS. Luego se añadieron 200 µL de PBS frío (pH 7,4) y 6 µL (316 pmol) de IL-18 al anticuerpo MOR9464 inmovilizado y se incubaron durante 15 min a 4°C. Después de la incubación, el complejo se centrifugó y se lavó con 200 µL de PBS y se centrifugó nuevamente. Para el intercambio de deuterio, se añadieron 200 µL de tampón de PBS de deuterio al 83,6% al complejo de antígeno-anticuerpo para la incubación a 4 °C durante 3 o 25 min. Luego se separó el tampón de deuterio, e inmediatamente se añadieron 125 µL de tampón de extinción (como arriba). Después del enfriamiento brusco, el flujo continuo se transfirió a un vial de HPLC pre-enfriado rápidamente y se analizó utilizando el análisis idéntico en línea de digestión con pepsina/LC-MS que se realizó en los experimentos de control. Las amidas del esqueleto que están presentes en la interfaz antígeno-anticuerpo incorporarán menos deuterones en un tiempo de intercambio dado en relación con los experimentos de control. Al comparar los patrones H/Dx de los experimentos de marcaje y control, el epítipo se revela como ese área del antígeno que está protegida contra el intercambio en los experimentos de marcaje.

Los resultados de este análisis, cuando se realizó con MOR9464, revelaron las tres regiones más importantes de protección en IL-18. Estas fueron (con referencia a SEQ ID NO: 1) desde el aminoácido 87 al 99, desde el aminoácido 119 al 137 y desde el aminoácido 138 al 160. Se demuestra que estas regiones contienen aminoácidos que están implicados en la unión de la IL-18BP (Figura 12).

9.11) Caracterización estructural por rayos X de IL-18/fragmento de anticuerpo

La identificación general del epítipo proporcionada por el modelado y H/DxMS confirmó que los anticuerpos y fragmentos de los mismos tal se describe en esta memoria reconocen una región en IL-18 que también es reconocida

por IL-18BP (Figura 12). Para identificar los aminoácidos relevantes en IL-18 en estas regiones, se llevó a cabo la determinación de la estructura por rayos X de un complejo IL-18/anticuerpo.

Para preparar el fragmento de anticuerpo, 13 mg de MOR9464_N30K a una concentración de 18 mg/mL en Histidina 10 mM pH 5,0, se escindieron con papaína 1/300 (p/p) en Tris-HCl 100 mM pH 7,0, DTT 10 mM durante 200 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 50 μ M de inhibidor de papaína E64. El fragmento Fab se purificó luego sobre una columna de proteína A equilibrada con tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7,0.

Purificación del complejo Fab con IL-18: se añadió un exceso de 1,33 veces de IL-18 humana (1,6 mg en PBS) a 3,2 mg del fragmento de anticuerpo MOR9464_N30K (recuperado del flujo de Proteína A). El complejo de IL-18 con el fragmento de anticuerpo MOR9464_N30K se concentró por ultrafiltración, se cargó en una cromatografía de exclusión por tamaño SPX-75 y se eluyó isocráticamente en Tris-HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 25 mM.

Cristalización: el complejo de fragmentos de anticuerpo IL-18/MOR9464_N30K se concentró por ultrafiltración a 11,8 mg/mL y se realizó el rastreo de cristalización por difusión de vapor en gotas en placas de 96 pocillos. Los experimentos se configuraron con un sistema robótico Phoenix y se almacenaron en un hotel RockImager a 19°C. Se identificaron y caracterizaron dos formas cristalinas (forma A y forma B):

1) La forma cristalina A creció a partir de sulfato de litio 0,1 M, ADA 0,1 M, pH 6,5, 12% de PEG 4.000. (El crioprotector era una mezcla 1:1 de la solución del depósito con 20% de PEG 4.000, 30% de glicerol)

2) La forma cristalina B creció de 59,5% de 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD), 15% de glicerol, HEPES 85 mM, pH 7,5. (No se necesita crioprotector).

Los datos de rayos X se recogieron en Swiss Light Source, línea de haz X10SA, con un detector de píxeles Pilatus. Todas las imágenes de difracción se procesaron con XDS (versión 6 de diciembre de 2010), tal como se implementó en APRV.

Para la forma cristalina A se grabaron 720 imágenes de oscilación de 0,25° cada una a una distancia de cristal a detector de 460 mm, utilizando radiación de rayos X de 0,99999 Å de longitud de onda.

Para la forma cristalina B, se grabaron 720 imágenes de oscilación de 0,25° cada una a una distancia de cristal a detector de 430 mm, utilizando radiación de rayos X de 0,99984 Å de longitud de onda.

La estructura de la forma cristalina A se determinó mediante reemplazo molecular con el programa Phaser, utilizando la entrada de PDB 3GBM.pdb y 2VXT.pdb como modelos de partida para el fragmento de anticuerpo MOR9464_N30K y la molécula de IL-18, respectivamente. Los dominios variables y primeros dominios constantes del fragmento de anticuerpo en 3GBM.pdb se utilizaron como modelos de búsqueda independientes. Se obtuvo fácilmente una solución transparente para un complejo de fragmento de anticuerpo IL-18/MOR9464_N30K por unidad asimétrica. La estructura de la forma cristalina B se determinó de la misma manera, pero utilizando los modelos refinados derivados de la forma cristalina A en lugar de las entradas PDB.

Refinamiento de la estructura: la estructura se refinó mediante múltiples ciclos de inspección de mapas de densidad electrónica y reconstrucción del modelo en Coot 0.6.2, seguido de un refinamiento automático utilizando autoBUSTER (1.11.2/buster 2.11.2). Los contactos intermoleculares se identificaron con NCONT y la superficie enterrada se analizó con AREAIMOL, ambos del conjunto de programas CCP4 (versión 6.1.2). La recopilación de datos de rayos X y las estadísticas de refinamiento se muestran en la Tabla 4 que figura a continuación.

Tabla 4 Recopilación de datos de rayos X y estadísticas de refinamiento

	Forma cristalina A	Forma cristalina B
Recopilación de datos		
Grupo espacial	P2 ₁	C2
Dimensiones de la celda		
a, b, c (Å)	43,46, 85,86, 85,77	213,72, 41,81, 71,37
α , β , γ (°)	90,00, 94,29, 90,00	90,00, 100,13, 90,00
Resolución (Å)	2,80 (2,87-2,80)*	2,70 (2,77-2,70)*
R _{sim} o R _{fusión}	0,10 (0,454)	0,074 (0,487)
// σ /	13,0 (3,2)	12,0 (2,8)
Compleción (%)	98,7 (98,2)	98,8 (98,6)

Redundancia	3,4 (3,5)	3,3 (3,4)
Refinamiento		
Resolución (Å)	85,53-2,80	54,19-2,70
Nº reflexiones	15,406	17,335
$R_{\text{trabajo}} / R_{\text{libre}}$	0,175 / 0,257	0,192 / 0,254
Nº átomos		
Proteína	4,447	4,445
Componente tampón	10 (2 iones sulfato)	6 (1 glicerol)
Agua	89	62
Factores B (Å ²)		
Cadena ligera (L) de Ac	54,3 (VL: 34,6 (Vc: 76,5))	50,3
Cadena pesada (H) de Ac	37,0	51,4
hIL-18 (I)	35,3	64,7
Agua	30,4	51,6
Desviaciones r.c.m.		
Longitudes de enlaces (Å) / ángulos (°)	0,010 / 1,31	0,010 / 1,28

La vista general de la estructura del complejo del fragmento IL-18/MOR9464_N30K se muestra en la Figura 13. Tras la formación del complejo, se identifican 36 aminoácidos en IL-18 con accesibilidad reducida al disolvente en la interfaz de unión de IL-18 con el fragmento de anticuerpo. Estos residuos son Leu41, Glu42, Met87, Tyr88, Lys89, Asp90, Ser91, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Ala97, Phe138, Gln139, Arg140, Ser141, Val142, Pro143, Gly144, His145, Asp146, Asn147, Met149, Gln150, Glu152, Ser153, Ser154, Glu157, Gly158, Phe160, Glu177, Asp178, Glu179, Leu180 y Gly181.

La caracterización ulterior de los contactos relevantes realizados en la interfaz del complejo identificó que Arg140 y Glu152 son los aminoácidos que probablemente contribuyan más a esta formación del complejo particular. Ambos residuos están ubicados en el centro de la interfaz de unión y contribuyen a un gran número de contactos intermoleculares (21 y 18, respectivamente, utilizando una distancia de corte de 4,0 Å). Arg140 interactúa con los residuos de L-CDR3 (Tyr94L) y H-CDR3 (Tyr101H, His102H). Glu152 forma una interacción de puente de sal fuerte (enterrada) con L-CDR2 Arg51L y acepta un enlace H de L-CDR3 Tyr94L. Todos los residuos en las cadenas de anticuerpos están numerados secuencialmente, la letra L o H después del número de residuo indica un residuo en la cadena ligera o cadena pesada, respectivamente.

La estructura tridimensional del complejo de fragmento de anticuerpo IL-18/MOR9464_N30K permitió algunas investigaciones adicionales sobre la diferente reactividad cruzada entre la IL-18 humana y la IL-18 de cynomolgus. MOR9464_N30K es 10 veces más débil contra la IL-18 de cynomolgus (20 pM) en comparación con 2 pM contra la IL-18 humana (Tabla 2). La IL-18 de cynomolgus difiere de la IL-18 humana en 6 posiciones (humana frente a cynomolgus): V47I; S86N; T99A; K115R; F170Y y E177K (Figura 14(A)). De estas posiciones solo el ácido glutámico 177 (Glu177; E177) está en la interfaz del complejo IL-18/fragmento de anticuerpo (Figura 14 (B)). Por lo tanto, es discutible que K177 en la secuencia de mono cynomolgus de la IL-18 de cynomolgus provoque una caída de 10 veces en la afinidad con MOR9464_N30K como se indica en la Tabla 2A columna 1, lea K_D (SET, pM) para MOR9464_N30K para IL-18 humana es 2 ± 1 pM mientras que para IL-18 de cynomolgus es 20 ± 10 pM.

Con el fin de identificar con qué parte del fragmento de anticuerpo IL-18R α MOR9464_N30K compite, se realizó una superposición del complejo de fragmento de anticuerpo IL-18/MOR9464_N30K con el complejo IL-18/IL-18R α . En resumen, las estructuras de IL-18 en el complejo IL-18/IL-18R α e IL-18 en el complejo IL-18/MOR9464_N30K se superpusieron utilizando el comando de alineamiento en PyMol (Sistema gráfico molecular PyMol, versión 1.2 r3pre, Schrödinger LLC).

Como se muestra en la Figura 15, parece que el fragmento de anticuerpo MOR9464_N30K compite con el dominio D3 de Ig de IL-18R α para unirse a IL-18.

De manera similar, la estructura del complejo de fragmento de anticuerpos IL-18/MOR9464_N30K se superpuso a la estructura de la IL-18 humana en complejo con IL-18BP de poxvirus (archivo de coordenadas utilizado 3F62.pdb) utilizando el comando "alineal" en PyMOL (El sistema PyMOL Molecular Graphic, versión 1.5.0., Schrödinger LLC).

Como se muestra en la Figura 16, IL-18BP de poxvirus choca con el dominio variable de la cadena pesada del fragmento de anticuerpo MOR9464_N30K y compite predominantemente por la unión de los residuos de aminoácidos Met87 a Met96 en IL-18.

Estos hallazgos confirman adicionalmente los datos bioquímicos y de agrupación de epítomos mostrados en esta memoria y demuestran que las moléculas de unión tal como se describen en esta memoria, en particular los anticuerpos y sus fragmentos, no se unen al complejo IL-18/IL-18BP.

Finalmente, se realizó una comparación con el anticuerpo murino 125-2H de la técnica anterior. El análisis se llevó a cabo con la estructura del fragmento de anticuerpo 125-2H como se encuentra en el archivo 2VXT.pdb. En resumen, la estructura de IL-18 en complejo con el fragmento de anticuerpo MOR9464_N30K se superpuso en IL-18 en complejo con el Fab 125-2H utilizando el comando "alineal" en PyMOL (El Sistema Gráfico Molecular PyMOL, versión 1.5.0., Schrödinger LLC).

Como se muestra en la Figura 17, el fragmento de anticuerpo MOR9464_N30K (lado izquierdo de la superposición) y el fragmento de anticuerpo 125-2H (lado derecho de la superposición) se solapan al reconocer la IL-18. Sin embargo, el fragmento de anticuerpo 125-2H no se une al epítipo reconocido por IL-18BP tal como se muestra en la Figura 18, en que el complejo 125-2H/IL-18 se superpuso con el complejo IL-18BP/IL de poxvirus. Estos datos confirman adicionalmente, tanto la bibliografía de la técnica anterior con respecto a 125-2H (Argiriadi M.A. et al (2009) J.Biol.Chem. 284: 24478) como los datos bioquímicos y de agrupación de epítomos mostrados en esta memoria que el anticuerpo murino 125-2H se une al complejo IL-18/IL-18BP.

Finalmente, tal como se muestra en la Figura 19, Lisina en la posición 30 en la cadena pesada de MOR9464_N30K parece formar interacciones electrostáticas/polares con Asp 146 y Asn 147 de la IL-18 humana, lo que indica que lisina 30 está implicada en la formación del complejo anticuerpo-antígeno. Por lo tanto, es evidente que una modificación exocelular tal como se describe en la sección 9.2 en esta memoria tal como la desamidación de asparagina, puede haber contribuido a la pérdida de potencia con el tiempo de MOR9464. El reemplazo de asparagina 30 por una lisina en MOR9464_N30K parece proporcionar a MOR9464_N30K con estabilidad incrementada.

Tabla de correlación de secuencias

SEQ ID NO:	Identidad
1	IL-18 humana
2	IL-18 de cynomolgus
3	H-CDR1 of MOR8775; MOR9464; MOR9441; MOR10222; MOR10579; MOR9464_N30K; MOR10222_N30S_M54I; MOR9465; MOR9466;
4	H-CDR2 de MOR8775;
5	H-CDR3 de MOR8775; MOR9464; MOR9441; MOR10222; MOR10579; MOR9464_N30K; MOR10222_N30S_M54I; MOR9465; MOR9466;
6	L-CDR1 de MOR8775; MOR9464; MOR9441; MOR10222; MOR10579; MOR9464_N30K; MOR10222_N30S_M54I; MOR9465; MOR9466;
7	L-CDR2 de MOR8775; MOR9464; MOR9441; MOR10222; MOR10579; MOR9464_N30K; MOR10222_N30S_M54I; MOR9465; MOR9466;
8	L-CDR3 de MOR8775; MOR9464; MOR9441; MOR10222; MOR10579; MOR9464_N30K; MOR10222_N30S_M54I; MOR9465; MOR9466;
9	H-CDR2 de MOR9464; MOR10222; MOR9464_N30K;
10	H-CDR2 de MOR9441; MOR10579;
11	H-CDR2 de MOR9465
12	H-CDR2 de MOR9466
13	H-CDR2 de MOR10222_N30S_M54I;
14	VH de MOR9464_N30K
15	Polinucleótido VH de MOR9464_N30K
16	VL de MOR9464_N30K; MOR9464; MOR8775; MOR9465; MOR9466; MOR9441
17	Polinucleótido VL de MOR9464_N30K
18	VH de MOR10222_N30S_M54I
19	Polinucleótido VH de MOR10222_N30S_M54I
20	VL de MOR10222_N30S_M54I; MOR10579; MOR10222
21	Polinucleótido VL de MOR10222_N30S_M54I
22	VH MOR8775;
23	Polinucleótido VH MOR8775
24	Polinucleótido VL MOR8775
25	VH MOR9441;
26	Polinucleótido VH MOR9441
27	Polinucleótido VL MOR9441
28	VH MOR9464;
29	Polinucleótido VH MOR9464
30	Polinucleótido VL MOR9464

31	VH MOR9465;
32	Polinucleótido VH MOR9465
33	Polinucleótido VL MOR9465
34	VH MOR9466;
35	Polinucleótido VH MOR9466
36	Polinucleótido VL MOR9466
37	VH MOR10579;
38	Polinucleótido VH MOR10579
39	Polinucleótido VL MOR10579
40	VH MOR10222;
41	Polinucleótido VH MOR10222
42	Polinucleótido VL MOR10222
43	Cadena pesada de MOR9464 N30K
44	Polinucleótido de la cadena pesada de MOR9464 N30K
45	Cadena ligera de MOR9464 N30K; MOR9464; MOR8775; MOR9441
46	Polinucleótido de la cadena ligera de MOR9464 N30K
47	Cadena pesada MOR9464
48	Polinucleótido Cadena Pesada MOR9464
49	Polinucleótido Cadena Ligera MOR9464
50	Cadena pesada MOR9441
51	Polinucleótido Cadena Pesada MOR9441
52	Polinucleótido Cadena Ligera MOR9441
53	Cadena pesada MOR10222
54	Polinucleótido Cadena Pesada MOR10222
55	Polinucleótido Cadena Ligera MOR10222
56	Cadena pesada MOR8775
57	Polinucleótido Cadena Pesada MOR8775
58	Polinucleótido Cadena Ligera MOR8775
59	(Chothia) H-CDR1 MOR9464;
60	(Chothia) H-CDR2 MOR9464; MOR9464 N30K
61	(Chothia) H-CDR3 MOR9464; MOR9464 N30K; MOR10222 N30S M54I
62	(Chothia) L-CDR1 MOR9464; MOR9464 N30K; MOR10222 N30S M54I
63	(Chothia) L-CDR2 MOR9464; MOR9464 N30K; MOR10222 N30S M54I
64	(Chothia) L-CDR3 MOR9464; MOR9464 N30K; MOR10222 N30S M54I
65	(Chothia) H-CDR1 MOR9464 N30K;
66	(Chothia) H-CDR1 MOR10222 N30S M54I
67	(Chothia) H-CDR2 MOR10222 N30K M54I;
68	(Chothia) H-CDR1 MOR13363;
69	(Chothia) H-CDR2 MOR13363;
70	(Chothia) H-CDR3 MOR13363;
71	(Chothia) L-CDR1 MOR13363;
72	(Chothia) L-CDR2 MOR13363;
73	(Chothia) L-CDR3 MOR13363;
74	H-CDR1 de MOR8776; MOR10497; MOR10501; MOR10502;
75	H-CDR2 de MOR8776;
76	H-CDR2 de MOR10501
77	H-CDR2 de MOR1010502;
78	H-CDR2 de MOR10497;
79	H-CDR3 de MOR8776; MOR10497; MOR10501; MOR10502;
80	L-CDR1 de MOR8776; MOR10497; MOR10501; MOR10502;
81	L-CDR2 de MOR8776; MOR10497; MOR10501; MOR10502;
82	L-CDR3 de MOR8776; MOR10497; MOR10501; MOR10502;
83	VH MOR8776;
84	Polinucleótido VH MOR8776;
85	VL MOR8776; MOR10497; MOR10501; MOR10502
86	Polinucleótido VL MOR8776
87	VH MOR10497;
88	Polinucleótido VH MOR10497
89	Polinucleótido VL MOR10497;
90	VH MOR10501;
91	Polinucleótido VH MOR10501;
92	Polinucleótido VL MOR10501;
93	VH MOR10502;

94	Polinucleótido VH MOR10502;
95	Polinucleótido VL MOR10502;
96	Cadena Pesada de MOR8776;
97	Polinucleótido de la Cadena Pesada de MOR8776;
98	Cadena Ligera de MOR8776; MOR10497
99	Polinucleótido de la Cadena Ligera de MOR8776;
100	Cadena pesada MOR10579;
101	Polinucleótido Cadena Pesada MOR10579;
102	Polinucleótido Cadena Ligera MOR10579
103	Cadena pesada MOR10497;
104	Polinucleótido Cadena Pesada MOR10497;
105	Polinucleótido Cadena Ligera MOR10497
106	H-CDR1 de MOR13363; MOR13361
107	H-CDR2 de MOR13363
108	H-CDR3 de MOR13363; MOR13361
109	L-CDR1 de MOR13363; MOR13361
110	L-CDR2 de MOR13363; MOR13361
111	L-CDR3 de MOR13363
112	VH de MOR13363
113	Polinucleótido VH de MOR13363
114	VL de MOR13363
115	Polinucleótido VL de MOR13363
116	Cadena Pesada de MOR13363
117	Polinucleótido de la Cadena Pesada de MOR13363
118	Cadena Ligera de MOR13363
119	Polinucleótido de la Cadena Ligera de MOR13363
120	H-CDR1 MOR13341; MOR13342; MOR13347
121	H-CDR2 MOR13341; MOR13342; MOR13347
122	H-CDR2 MOR13361
123	H-CDR3 MOR13341; MOR13342; MOR13347
124	L-CDR1 MOR13341; MOR13342; MOR13347
125	L-CDR2 MOR13341; MOR13342; MOR13347
126	L-CDR3 MOR13361
127	L-CDR3 MOR13341
128	L-CDR3 MOR13342
129	L-CDR3 MOR13347
130	VH MOR13341; MOR13342; MOR13347
131	Polinucleótido VH MOR13341
132	VL MOR13341
133	Polinucleótido VL MOR13341
134	Cadena Pesada MOR13341; MOR13342; MOR13347
135	Polinucleótido Cadena Pesada MOR13341
136	Cadena Ligera MOR13341
137	Polinucleótido Cadena Ligera MOR13341
138	VH MOR13361
139	Polinucleótido VH MOR13361
140	VL MOR13361
141	Polinucleótido VL MOR13361
142	Cadena pesada MOR13361
143	Polinucleótido Cadena Pesada MOR13361
144	Cadena Ligera MOR13361
145	Polinucleótido Cadena Ligera MOR13361
146	Polinucleótido VH MOR13342
147	VL MOR13342
148	Polinucleótido VL MOR13342
149	Polinucleótido Cadena Pesada MOR13342
150	Cadena Ligera MOR13342
151	Polinucleótido Cadena Ligera MOR13342
152	Polinucleótido VH MOR13347

153	VL MOR13347
154	Polinucleótido VL MOR13347
155	Polinucleótido Cadena Pesada MOR13347
156	Cadena Ligera MOR13347
157	Polinucleótido Cadena Ligera MOR13347
158	Cadena Pesada de MOR10222_N30S_M54I
159	Polinucleótido de la Cadena Pesada de MOR10222_N30S_M54I
160	Cadena Ligera de MOR10222_N30S_M54I; MOR10222; MOR10579
161	Polinucleótido de la Cadena Ligera de MOR10222_N30S_M54I
162	(Chothia) H-CDR1 MOR10497
163	(Chothia) H-CDR2 MOR10497
164	(Chothia) H-CDR3 MOR10497
165	(Chothia) L-CDR1 MOR10497
166	(Chothia) L-CDR2 MOR10497
167	(Chothia) L-CDR3 MOR10497
168	Cadena pesada MOR10501
169	Polinucleótido Cadena Pesada MOR10501
170	Cadena Ligera MOR10501
171	Polinucleótido Cadena Ligera MOR10501
172	Cadena pesada MOR10502
173	Polinucleótido Cadena Pesada MOR10502
174	Cadena Ligera MOR10502
175	Polinucleótido Cadena Ligera MOR10502
176	Cadena pesada MOR9465
177	Polinucleótido Cadena Pesada MOR9465
178	Cadena Ligera MOR9465
179	Polinucleótido Cadena Ligera MOR9465
180	Cadena pesada MOR9466
181	Polinucleótido Cadena Pesada MOR9466
182	Cadena Ligera MOR9466
183	Polinucleótido Cadena Ligera MOR9466
184	(Chothia) H-CDR1 MOR8776
185	(Chothia) H-CDR2 MOR8776
186	(Chothia) H-CDR3 MOR8776
187	(Chothia) L-CDR1 MOR8776
188	(Chothia) L-CDR2 MOR8776
189	(Chothia) L-CDR3 MOR8776
190	(Chothia) H-CDR1 MOR10501
191	(Chothia) H-CDR2 MOR10501
192	(Chothia) H-CDR3 MOR10501
193	(Chothia) L-CDR1 MOR10501
194	(Chothia) L-CDR2 MOR10501
195	(Chothia) L-CDR3 MOR10501
196	H-CDR2 MOR10502
197	(Chothia) H-CDR1 MOR10502
198	(Chothia) H-CDR2 MOR10502
199	(Chothia) H-CDR3 MOR10502
200	(Chothia) L-CDR1 MOR10502
201	(Chothia) L-CDR2 MOR10502
202	(Chothia) L-CDR3 MOR10502
203	(Chothia) H-CDR1 MOR8775
204	(Chothia) H-CDR2 MOR8775
205	(Chothia) H-CDR3 MOR8775
206	(Chothia) L-CDR1 MOR8775
207	(Chothia) L-CDR2 MOR8775
208	(Chothia) L-CDR3 MOR8775
209	(Chothia) H-CDR1 MOR9441
210	(Chothia) H-CDR2 MOR9441
211	(Chothia) H-CDR3 MOR9441
212	(Chothia) L-CDR1 MOR9441
213	(Chothia) L-CDR2 MOR9441
214	(Chothia) L-CDR3 MOR9441
215	(Chothia) H-CDR1 MOR9465

216	(Chothia) H-CDR2 MOR9465
217	(Chothia) H-CDR3 MOR9465
218	(Chothia) L-CDR1 MOR9465
219	(Chothia) L-CDR2 MOR9465
220	(Chothia) L-CDR3 MOR9465
221	(Chothia) H-CDR1 MOR9466
222	(Chothia) H-CDR2 MOR9466
223	(Chothia) H-CDR3 MOR9466
224	(Chothia) L-CDR1 MOR9466
225	(Chothia) L-CDR2 MOR9466
226	(Chothia) L-CDR3 MOR9466
227	(Chothia) H-CDR1 MOR10579
228	(Chothia) H-CDR2 MOR10579
229	(Chothia) H-CDR3 MOR10579
230	(Chothia) L-CDR1 MOR10579
231	(Chothia) L-CDR2 MOR10579
232	(Chothia) L-CDR3 MOR10579
233	(Chothia) H-CDR1 MOR10222
234	(Chothia) H-CDR2 MOR10222
235	(Chothia) H-CDR3 MOR10222
236	(Chothia) L-CDR1 MOR10222
237	(Chothia) L-CDR2 MOR10222
238	(Chothia) L-CDR3 MOR10222
239	H-CDR2 MOR10222 N30S M54I
240	(Chothia) H-CDR1 MOR13341
241	(Chothia) H-CDR2 MOR13341
242	(Chothia) H-CDR3 MOR13341
243	(Chothia) L-CDR1 MOR13341
244	(Chothia) L-CDR2 MOR13341
245	(Chothia) L-CDR3 MOR13341
246	(Chothia) H-CDR1 MOR13342
247	(Chothia) H-CDR2 MOR13342
248	(Chothia) H-CDR3 MOR13342
249	(Chothia) L-CDR1 MOR13342
250	(Chothia) L-CDR2 MOR13342
251	(Chothia) L-CDR3 MOR13342
252	(Chothia) H-CDR1 MOR13347
253	(Chothia) H-CDR2 MOR13347
254	(Chothia) H-CDR3 MOR13347
255	(Chothia) L-CDR1 MOR13347
256	(Chothia) L-CDR2 MOR13347
257	(Chothia) L-CDR3 MOR13347
258	(Chothia) H-CDR1 MOR13361
259	(Chothia) H-CDR2 MOR13361
260	(Chothia) H-CDR3 MOR13361
261	(Chothia) L-CDR1 MOR13361
262	(Chothia) L-CDR2 MOR13361
263	(Chothia) L-CDR3 MOR13361

Listado de Secuencias

SEQ ID NO:1

MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENLESDFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMT
DSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFQOR
SVPGHDKMKQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNE

5

SEQ ID NO:2

MAAEPEDNCINFVAMKPIDSTLYFIAEDDENLESDFGKLESKLSIIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMT
DSDCRDNAPRTIFIINMYKDSQPRGMAVAISVKCEKISTLSCENRIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFQOR
SVPGHDKMKQFESSSYEGYFLACEKERDLYKLILKKKDELGDRSIMFTVQNE

SEQ ID NO:3

SYAIS

10

SEQ ID NO:4

GIIPYGTANYAQKFQG

SEQ ID NO:5

AAYHPLVFDN

15

SEQ ID NO:6

SGSSSNIGNHYVN

20

SEQ ID NO:7

RNNHRPS

SEQ ID NO:8

QSWDYSGFSTV

25

SEQ ID NO:9

NIIPMTGQTYAQKFQG

SEQ ID NO:10

WINPFYIGETFYAQKFQG

30

SEQ ID NO:11

NIIPHYGFAYYQKFQG

35

SEQ ID NO:12

NIIPYSGFAYYQKFQG

SEQ ID NO:13

NIIPITGQTYAQKFQG

40

SEQ ID NO:14

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFKSYAISWVRQAPGQGLEWMGNIIPMTGQTYAQKFQGRVTI
TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAYHPLVFDNWDGQGLVTVSS

45

SEQ ID NO:15

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACCGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAG
CTAGTGGCGGCACCTTCAAGTCCTACGCTATTAGCTGGGTGACACAGGCCCCAGGTCAGGGCCTGGAGTG
GATGGGCAATATTATCCCTATGACCGGTCAGACCTACTACGCTCAGAAATTTAGGGTAGAGTGACTATC
ACCGCCGACGAGTCTACTAGCACCGCCTATATGGAAGTGTCTAGCCTGAGATCAGAGGACACCGCCGTCT
ACTACTGCGCTAGAGCCGCCTATCACCCCTGGTGTTCGATAACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGT
GTCTAGC

SEQ ID NO:16

DIVLTQPPSVSGAPGQRTVISCSSSSNIGNHYVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNHRPSGVPDRFSGSKSGT
SASLAITGLQSEADYYCQSWDYSGFSTVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO:17

GATATCGTCCTGACTCAGCCCCCTAGCGTCAGCGGCGCTCCCGGTCAGAGAGTGACTATTAGCTGTAGCG
GCTCTAGCTCTAATATCGGTAATCACTACGTGAAGTGGTATCAGCAGCTGCCCGGCACCGCCCCCTAAGCT
GCTGATCTATAGAAACAATCACCGGCCTAGCGGCGTGCCCGATAGGTTTAGCGGATCTAAGTCAGGCACT
AGCGCTAGTCTGGCTATCACCGGACTGCAGTCAGAGGACGAGGCCGACTACTACTGTCAGTCCTGGGACT
ATAGCGGCTTTAGCACCGTGTTTCGGCGGAGGCACTAAGCTGACCGTGCTG

5 SEQ ID NO:18

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGNIIPITGQTYYAQKFQGRVTI
TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAYHPLVFDNWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:19

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAG
CTAGTGGCGGCACCTTCTCTAGCTACGCTATTAGCTGGGTGACACAGGCCCCAGGTGAGGCTGGAGTG
GATGGGCAATATTATCCCTATCACCGGTGACCTACTACGCTCAGAAATTTAGGGTAGAGTGACTATC
ACCGCCGACGAGTCTACTAGCACCGCCTATATGGAAGTGTCTAGCCTGAGATCAGAGGACACCGCCGTCT
ACTACTGCGCTAGAGCCGCTATACCCCCCTGGTGTTTCGATAACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGT
GTCTAGC

10

SEQ ID NO:20

QSVLTQPPSASGTPGQRVITISCSGSSSNIGNHYVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNHRPSGVPDRFSGSKSGT
SASLAISGLQSEDEADYYCQSWDYSGFSTVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO:21

CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCCTAGCGCTAGTGGCACCCCTGGTCAGAGAGTGACTATTAGCTGTAGCG
GCTCTAGCTCTAATATCGGTAATCACTACGTGAAGTGGTATCAGCAGCTGCCCGGCACCGCCCCCTAAGCT
GCTGATCTATAGAAACAATCACCGGCCTAGCGGCGTGCCCGATAGGTTTAGCGGATCTAAGTCAGGGACT
AGCGCTAGTCTGGCTATTAGCGGCCTGCAGTCAGAGGACGAGGCCGACTACTACTGTCAGTCCTGGGACT
ATAGCGGCTTTAGCACCGTGTTTCGGCGGAGGCACTAAGCTGACCGTGCTG

15

SEQ ID NO:22

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFNSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPITYGTANYAQKFQGRVTI
TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAYHPLVFDNWGQGTLVTVSS

20 SEQ ID NO:23

CAGGTGCAATTGGTTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAGAAACCGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAG
CCTCCGAGGCACTTTTAATTCTTATGCTATTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTG
GATGGGCGGTATCATTCCGATTTATGGCACTGCGAATTACGCGCAGAAGTTTCAGGGCCGGGTGACCATT
ACCGCGGATGAAAGCACCAGCACCGCGTATATGGAAGTACGAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGT
ATTATTGCGCGCGTGCTGCTTATCATCCTCTTGTTTTTGATAATTGGGGCCAAGGCACCCCTGGTGACGGT
TAGCTCA

SEQ ID NO:24

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTGGCGCACCAAGGTCAGCGTGTGACCATCTCGTGTAGCG
GCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGAATTGGTACCAGCAGTTGCCCGGACGGCGCCGAAACT
TCTGATTTATCGTAATAATCATCGTCCCTCAGGCGTGCCGATCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACC
AGCGCGAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCCAGTCTTGGGATT
ATTCTGGTTTTTCTACTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTA

25

SEQ ID NO:25

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFNSYAI SWVRQAPGQGLEWMGWINPFYIGETFYAQKFQGRVT
ITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAYHPLVFDNWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:26

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGCTCCTCCGTCAAGGTGTCCTGCAAGG
CCTCCGGCGGCACCTTCAACTCCTACGCTATCTCTTGGGTGCGCCAGGCTCCCGGACAGGGCCTGGAGTG
GATGGGCTGGATCAACCTTTCTACATCGGCGAGACATTCTACGCCAGAAAGTTCCAGGGCAGAGTCACC
ATCACCGCCGACGAGTCCACCTCCACCGCCTACATGGAGCTGTCTCCCTGCGGTGAGAGGACACCGCCG
TGTACTACTGCGCCAGGGCCGCTACCACCCTCTGGTGTTCGACAACCTGGGGCCAGGGCACCTGGTGAC
CGTGTCTCTCC

SEQ ID NO:27

GATATCGTGCTGACCCAGCCTCCTTCTGTGTCTGGCGCCCCTGGCCAGAGAGTGACCATCTCCTGCTCTG
GCTCCTCCTCCAATATCGGCAACCACTACGTGAACTGGTATCAGCAGCTGCCCCGAACCGCCCCTAAGCT
GCTGATCTACCGGAACAACCAACCGGCCTTCCGGCGTGCCCGACCGGTTCTCCGGCTCCAAGTCTGGCACC
TCTGCCTCCCTGGCCATCACCGGCCTGCAGTCCGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCCAGTCTCTGGGACT
ACTCCGGCTTCTCAACCGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCTG

5

SEQ ID NO:28

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFNYSYAISWVRQAPGQGLEWMGNIIPMTGQTYYAQKFQGRVTI
TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAYHPLVFDNWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:29

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGCTCCTCCGTCAAGGTGTCCTGCAAGG
CCTCCGGCGGCACCTTCAACTCCTACGCTATCTCTTGGGTGCGCCAGGCTCCCGGACAGGGCCTGGAGTG
GATGGGCAACATCATCCCTATGACCGGCCAGACCTACTACGCCAGAAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATC
ACCGCCGACGAGTCCACCTCCACCGCCTACATGGAGCTGTCTCCCTGCGGTGAGAGGACACCGCCGTGT
ACTACTGCGCCAGGGCCGCTACCACCCTCTGGTGTTCGACAACCTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGT
GTCCTCC

10

SEQ ID NO:30

GACATCGTGCTGACACAGCCTCCCTCTGTGTCTGGCGCCCCTGGCCAGAGAGTGACCATCTCCTGCTCTG
GCTCCTCCTCCAATATCGGCAACCACTACGTGAACTGGTATCAGCAGCTGCCCCGAACCGCCCCTAAGCT
GCTGATCTACCGGAACAACCAACCGGCCTTCCGGCGTGCCCGACCGGTTCTCCGGCTCCAAGTCTGGCACC
TCTGCCTCCCTGGCCATCACCGGCCTGCAGTCCAGGACGAGGCCGACTACTACTGCCAGTCTCTGGGACT
ACTCCGGCTTCTCCACCGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCTG

15

SEQ ID NO:31

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFNYSYAISWVRQAPGQGLEWMGNIIPHYGFAYYAQKFQGRVTI
TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAYHPLVFDNWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:32

GAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAAG
CCTCCGGAGGCACTTTTAATTCTTATGCTATTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTG
GATGGGCAATATTATTCCTCATTATGGTTTTGCTTATTATGCTCAGAAGTTTCAGGGTCGGGTGACCATT
ACCGCGGATGAAAGCACCAGCACCGCGTATATGGAAGTGAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGT
ATTATTGCGCGCGTGCTGCTTATCATCTCTTGTTTTTGATAATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGT
TAGCTCA

20

SEQ ID NO:33

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTGGCGCACCAGGTCAGCGTGTGACCATCTCGTGTAGCG
GCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGAATTGGTACCAGCAGTTGCCCGGGACGGCGCCGAAACT
TCTGATTTATCGTAATAATCATCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACC
AGCGCGAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCCAGTCTTGGGATT
ATTCTGGTTTTTCTACTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTA

25

SEQ ID NO:34

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNYSYISWVRQAPGQGLEWMGNIIPYSGFAYYAQKFQGRVTI
TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAHYHPLVFDNWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:35

GAGGTGCAATTGGTTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAG
CCTCCGGAGGCACTTTTAAATCTTATGCTATTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTG
GATGGGCAATATTATTCCTTATTCTGGTTTTGCTTATTATGCTCAGAAAGTTTCAGGGTCGGGTGACCATT
ACCGCGGATGAAAGCACCAGCACCAGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGT
ATTATTGCGCGCGTGCTGCTTATCATCTCTTGTTTTGGATAATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGT
TAGCTCA

5

SEQ ID NO:36

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTGGCGCACCAGGTCAGCGTGTGACCATCTCGTGTAGCG
GCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGAATTGGTACCAGCAGTTGCCCCGGACGGCGCCGAAACT
TCTGATTATCGTAATAATCATCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACC
AGCGCGAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCCAGTCTTGGGATT
ATTCTGGTTTTTCTACTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTA

SEQ ID NO:37

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNYSYISWVRQAPGQGLEWMGWINPFYIGETFYAQKFQGRVTI
ITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAHYHPLVFDNWGQGTLVTVSS

10

SEQ ID NO:38

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGCTCCTCCGTCAAGGTGTCCTGCAAGG
CCTCCGGCGGCACCTTCAACTCCTACGCTATCTCTTGGGTGCGCCAGGCTCCCGGACAGGGCCTGGAGTG
GATGGGCTGGATCAACCCCTTCTACATCGGCGAGACATTCTACGCCAGAAAGTTCCAGGGCAGAGTCACC
ATCACCGCCGACGAGTCCACCTCCACCGCCTACATGGAGCTGTCTCCTCGCGGTGAGAGACACCGCCG
TGTACTIONTGCAGGCGCCCTACCACTCTGGTGTTGACAACCTGGGGCCAGGGCACCTGGTGAC
CGTGTCCTCC

15

SEQ ID NO:39

CAGTCCGTGCTGACCCAGCCTCCTTCTGCCTCTGGCACCCCTGGCCAGAGAGTGACCATCTCCTGCTCTG
GCTCCTCCTCCAATATCGGCAACCACTACGTGAAGTGGTATCAGCAGCTGCCCCGAACCGCCCTAAGCT
GCTGATCTACCGGAACAACCAACCGGCCTTCCGGCGTGCCCGACCGGTTCTCCGGCTCCAAGTCTGGCACC
TCCGCTCCTTGGCCATCTCTGGCCTGCAGTCAGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCCAGTCTCTGGGACT
ACTCCGGCTTCTCCACCGTGTTCTGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCTG

SEQ ID NO:40

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNYSYISWVRQAPGQGLEWMGNIIPMTGQTYYAQKFQGRVTI
TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAHYHPLVFDNWGQGTLVTVSS

20

SEQ ID NO:41

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGCTCCTCCGTCAAGGTGTCCTGCAAGG
CCTCCGGCGGCACCTTCAACTCCTACGCCATCTCTTGGGTGCGCCAGGCTCCTGGACAGGGCCTGGAGTG
GATGGGCAACATCATCCCTATGACCGGCCAGACCTACTACGCCAGAAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATC
ACCGCCGACGAGTCCACCTCCACCGCCTACATGGAGCTGTCTCCTCGCGGTGAGAGACACCGCCGTGT
ACTACTGCGCCAGGGCCGCCTACCACTCTGGTGTTGACAACCTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGT
GTCCTCC

25

SEQ ID NO:42

CAGTCCGTGCTGACCCAGCCTCCTTCTGCCTCTGGCACCCCTGGCCAGAGAGTGACCATCTCCTGCTCTG
GCTCCTCCTCCAATATCGGCAACCACTACGTGAACTGGTATCAGCAGCTGCCCGGAACCGCCCCTAAGCT
GCTGATCTACCGGAACAACCACCGGCCTTCCGGCGTGCCCGACCGGTTCTCCGGCTCCAAGTCTGGCACC
TCCGCTCCCTGGCCATCTCTGGCCTGCAGTCAGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCCAGTCTCTGGGACT
ACTCCGGCTTCTCCACCGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGTCTG

SEQ ID NO:43

EVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFKSYAISWVRQAPGQGLEWMGNIIPMTGQTYYAQKFQGRVTI
TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAHYHPLVFDNWQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKRVPEPKSCKDHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

SEQ ID NO:44

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAG
CTAGTGGCGGCACCTTCAAGTCCTACGCTATTAGCTGGGTGAGACAGGCCCCAGGTGAGGGCCTGGAGTG
GATGGGCAATATTATCCCTATGACCGGTGAGACCTACTACGCTCAGAAATTTAGGGTAGAGTGACTATC
ACCGCCGACGAGTCTACTAGCACCGCCTATATGGAAGTGTCTAGCCTGAGATCAGAGGACACCGCCGTCT
ACTACTGCGCTAGAGCCGCCTATCACCCCTGGTGTTCGATAACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGT
GTCTAGCGCTAGCACTAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGC
ACAGTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAAGTCTGGCG
CCCTGACCTCTGGCGTGACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGT
GGTCACAGTGCCTTCAAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCAAGCCTTCCAAC
ACCAAGTGAGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCCTGCCCTGCTC
CTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCCCTGTTCCCTCCAAAGCCCAAGGACACCCCTGATGATCTCCCG
GACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGATCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTAC
GTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTACAAGTCCACCTACCGGG
TGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTCTCCAA
CAAGGCCCTGCCTGCCCCCTATCGAAAAGACAATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTG
TACACCTGCCACCCAGCCGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCT
TCTACCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACAAGTACAAGACACCCC
TCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCCTGTACTCCAAAGTACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAG
CAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGT
CCCTGTCTCCCGGCAAG

SEQ ID NO:45

DIVLTQPPSVSGAPGQRTISCSGSSSNIGNHYVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNHRPSGVPDRFSGSKSGT
SASLAITGLQSEDEADYYCQSWDYSGFSTVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLI
SDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV
APTECS

10

SEQ ID NO:46

GATATCGTCCTGACTCAGCCCCCTAGCGTCAGCGCGCTCCCGGTGAGAGAGTGACTATTAGCTGTAGCG
GCTCTAGCTCTAATATCGGTAATCACTACGTGAACTGGTATCAGCAGCTGCCCGGCACCGCCCCTAAGCT
GCTGATCTATAGAAACAATACCGGCCTAGCGCGCTGCCGATAGGTTTAGCGGATCTAAGTCAGGCACT
AGCGCTAGTCTGGCTATACCGGACTGCAGTCAGAGGACGAGGCCGACTACTACTGTGAGTCTCTGGGACT

ATAGCGGCTTTAGCACCGTGTTGCGCGGAGGCACTAAGCTGACCGTGCTGGGTCAGCCTAAGGCTGCCCC
CAGCGTGACCCTGTTCCCCCCCAGCAGCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATC
AGCGACTTCTACCCAGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGG
AGACCACCAACCCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGA
GCAGTGGAAGAGCCACAGGTCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAGAACCGTG
GCCCCAACCGAGTGCAGC

SEQ ID NO:47

EVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFNSYAIISWVRQAPGQGLEWMGNIIPMTGQTYYAQKFQGRVTI
TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAHYHPLVFDNWQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKRVKPKCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

SEQ ID NO:48

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGCTCCTCCGTCAAGGTGTCTGCAAGG
CCTCCGGCGGCACCTTCAACTCCTACGCTATCTCTTGGGTGCGCCAGGCTCCCGGACAGGGCCTGGAGTG
GATGGGCAACATCATCCCTATGACCGGCCAGACCTACTACGCCCAGAAGTTCAGGGCAGAGTCACCATC
ACCGCCGACGAGTCCACCTCCACCGCCTACATGGAGCTGTCTCCTGCGGTGAGAGGACACCGCCGTGT
ACTACTGCGCCAGGGCCGCTACCAACCTCTGGTGTTCGACAACCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGT
GTCCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGC
ACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTTGAACTCTGGCG
CCCTGACCTCTGGCGTGACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGT
GGTCACAGTGCCTTCAAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCAACAAGCCTTCCAAC
ACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCCTGCCCTGCTC
CTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCTGTTCCTTCCAAAGCCCAAGGACACCCCTGATGATCTCCCG
GACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGATCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTAC
GTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGG
TGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACACGAGTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTCTCCAA
CAAGGCCCTGCCTGCCCCATATCGAAAAGACAATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTG
TACACCTGCCACCCAGCCGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCT
TCTACCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCC
TCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCCAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAG
CAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGT
CCCTGTCTCCCGGCAAG

10

SEQ ID NO:49

GACATCGTGCTGACACAGCCTCCCTCTGTGTCTGGCGCCCCTGGCCAGAGAGTGACCATCTCCTGCTCTG
GCTCCTCCTCCAATATCGGCAACCACTACGTGAACGGTATCAGCAGCTGCCCCGAACCGCCCCCTAAGCT
GCTGATCTACCGGAACAACCACCGCCTTCCGGCGTGCCCGACCGGTTCTCCGGCTCCAAGTCTGGCACC
TCTGCCCTCCCTGGCCATCACCAGCCTGCAGTCAGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCCAGTCTGGGACT
ACTCCGGCTTCTCCACCGTGTTCGGCGGAGGACCAAGCTGACCGTGCTGGGACAGCCTAAGGCTGCCCC
CAGCGTGACCCTGTTCCCCCCCAGCAGCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATC
AGCGACTTCTACCCAGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGG
AGACCACCAACCCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGA
GCAGTGGAAGAGCCACAGGTCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAGAACCGTG
GCCCCAACCGAGTGCAGC

SEQ ID NO:50

EVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFNSYAI SWVRQAPGQGLEWMGWINPFYIGETFYAQKFQGRVT
ITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAHYPLVFDNWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:51

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGCTCCTCCGTCAAGGTGTCTTGCAAGG
CCTCCGGCGGCACCTTCAACTCCTACGCTATCTCTTGGGTGCGCCAGGCTCCCGGACAGGGCCTGGAGTG
GATGGGCTGGATCAACCCCTTCTACATCGGCGAGACATTCTACGCCAGAAGTTCAGGGCAGAGTCACC
ATCACCGCCGACGAGTCCACCTCCACCGCCTACATGGAGCTGTCTCCCTGCGGTGACAGGACACCGCCG
TGTAATACTGCGCCAGGGCCGCTACACCCCTCTGGTGTTCGACAACCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGAC
CGTGTCTCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTTCCAGCAAGTCTACCTCCGGC
GGCACAGCTGCTCTGGGTGCGCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTTGAACTCTG
GCGCCCTGACCTCTGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCTC
CGTGGTCAAGTGCCTTCAAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCC
AACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGCTAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCCTGCCCTG
CTCTGAAGCTGTGCGCGCCCTTCTGTGTTCTCTTCCCTCCAAAGCCAAAGGACACCCGTGATGATCTC
CCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAGCTGTCCCACGAGGATCCTGAAGTGAAGTTCAATTGG
TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACC
GGGTGGTGTCTCGTGTGCTGACCGTGTGACACGAGTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTCTC
CAACAAGGCCCTGCTGCCCCCTATCGAAAAGACAATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAG
GTGTACACCCCTGCCACCCAGCCGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGG
GCTTCTACCCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCAC
CCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCCAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGG
CAGCAGGGCAACGTGTTCTCTGCTCCTGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCC
TGTCCTGTCTCCCGCAAG

5

SEQ ID NO:52

GATATCGTGCTGACCCAGCCTCCTTCTGTGTCTGGCGCCCCCTGGCCAGAGAGTGACCATCTCCTGCTCTG
GCTCCTCCTCCAATATCGGCAACCACTACGTGAACGGTATCAGCAGCTGCCCGGAACCGCCCCCTAAGCT
GCTGATCTACCGGAACAACACCGGCCTTCCGGCTGCCCCGACCGGTTCTCCGGCTCCAAGTCTGGCACC
TCTGCCTCCCTGGCCATCACCGCCTGCAGTCCGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCCAGTCTCTGGGACT
ACTCCGGCTTCTCAACCGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGTGGGACAGCCTAAGGCTGCCCC
CAGCGTGACCTGTTCCCCCCCAGCAGCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATC
AGCGACTTCTACCCAGGCGCGGTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGG
AGACCACCAACCCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGA
GCAGTGGAAGAGCCACAGGTCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCACCCTGGAAAAGACCGTG
GCCCCAACCGAGTGCAGC

10

SEQ ID NO:53

EVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFNSYAI SWVRQAPGQGLEWMGNIIPMTGQTYYAQKFQGRVTI
TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAHYPLVFDNWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:54

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGCTCCTCCGTCAAGGTGTCCTGCAAGG
CCTCCGGCGGCACCTTCAACTCCTACGCCATCTCTTGGGTGCGCCAGGCTCCTGGACAGGGCCTGGAGTG
GATGGGCAACATCATCCCTATGACCGGCCAGACCTACTACGCCCAGAAGTTCAGGGCAGAGTCACCATC
ACCGCCGACGAGTCCACCTCCACCGCCTACATGGAGTGTCTCCTCCGTGCGGTGAGAGGACACCGCCGTGT
ACTACTGCGCCAGGGCCGCCCTACCACCTCTGGTGTTCGACAACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGT
GTCTCCCGCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGC
ACAGCTGCTCTGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAACCTCTGGCG
CCCTGACCTCTGGCGTGACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGT
GGTCACAGTGCCTTCAAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAAC
ACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCTGCCCTGCTC
CTGAAGTGTCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCTGTTCCTCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCG
GACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGATCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTAC
GTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGG
TGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACACGAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTCTCCAA
CAAGGCCCTGCCTGCCCCCTATCGAAAAGACAATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTG
TACACCTGCCACCCAGCCGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCT
TCTACCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCC
TCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCCAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAG
CAGGGCAACGTGTTCTCCTGTCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGT
CCCTGTCTCCCGGCAAG

SEQ ID NO:55

CAGTCCGTGCTGACCCAGCCTCCTTCTGCCTCTGGCACCCCTGGCCAGAGAGTGACCATCTCCTGCTCTG
GCTCCTCCTCCAATATCGGCAACCACTACGTGAACTGGTATCAGCAGCTGCCCCGAACCGCCCCCTAAGCT
GCTGATCTACCGGAACAACCACCGCCTTCCGGCGTGCCCCGACCGGTTCTCCGGCTCCAAGTCTGGCACC
TCCGCCCTCCCTGGCCATCTCTGGCCTGCAGTCAGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCCAGTCTCTGGGACT
ACTCCGGCTTCTCCACCGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGTCTGGGACAGCCTAAGGCTGCCCC
CAGCGTGACCCTGTTCCCCCCCAGCAGCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATC
AGCGACTTCTACCCAGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGG
AGACCACCACCCCCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGA
GCAGTGGAAGAGCCACAGGTCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAGAACCCGTG
GCCCCAACCGAGTGCAGC

5

SEQ ID NO:56

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFNSYAIISWVRQAPGQGLEWMGGIIPYGTANYAQKFQGRVTI
TADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAAHYHPLVFDNWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKRVKPKSCDKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:57

CAGGTGCAATTGGTTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAG
CCTCCGGAGGCACTTTTAAATCTTATGCTATTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTG
GATGGGCGGTATCATTCCGATTTATGGCACTGCGAATTACGCGCAGAAGTTTCAGGGCCGGGTGACCATT
ACCGCGGATGAAAGCACCAGCACCGCGTATATGGAAGTACGAGCAGCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGT
ATTATTGCGCGCGTGCTGCTTATCATCTCTTGTGTTTTGATAATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGT
TAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCG
CCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT
GGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC
ACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCAC
CTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG
GACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
GTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGG
TGGTCAGCGTCCTCACCCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA
CAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG
TACACCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT
TCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCC
TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG
CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT
CCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO:58

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTGGCGCACCAAGGTGAGCGTGACCATCTCGTGTAGCG
GCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGAATTGGTACCAGCAGTTGCCCCGGACGGCGCCGAAACT
TCTGATTTATCGTAATAATCATCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACC
AGCGCGAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCCAGTCTTGGGATT
ATTCTGGTTTTTCTACTGTGTTGGCGGGCGGCACGAAGTTAACCCTCCTAGGTGAGCCCAAGGCTGCCCC
CTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATA
AGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGG
AGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGA
GCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTG
GCCCCACAGAATGTTCA

5

SEQ ID NO:59
GGTFNSY

10

SEQ ID NO:60
IPMTGQ

SEQ ID NO:61
AAYHPLVFDN

15

SEQ ID NO:62
SSSNIGNHY

SEQ ID NO:63
RNN

20

SEQ ID NO:64
WDYSGFST

SEQ ID NO:65
GGTFKSY

25

SEQ ID NO:66
GGTFSSY

30

SEQ ID NO:67

IPITGQ

SEQ ID NO:68
GFTFSSY

5 **SEQ ID NO:69**
SGEGSN

10 **SEQ ID NO:70**
VMIGYGFDY

SEQ ID NO:71
SQSIFNY

15 **SEQ ID NO:72**
DSS

SEQ ID NO:73
YSGFLF

20 **SEQ ID NO:74**
TGSYYWN

SEQ ID NO:75
EINHMGITYYNPSLKG

25 **SEQ ID NO:76**
EIWHSGPTFYNPSLKS

SEQ ID NO:77
EIHGHGFTFYNPSLKS

30 **SEQ ID NO:78**
EIQSPGYTFYNPSLKS

35 **SEQ ID NO:79**
TTRYWMSHILAYGMDY

SEQ ID NO:80
SGSSSNIGNHYVS

40 **SEQ ID NO:81**
ANTKRPS

SEQ ID NO:82
SSYDGSQSIV

45 **SEQ ID NO:83**
QVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSISTGSYYWNWIRQAPGKGLEWIGEINHMGITYYNPSLKGRVT
ISVDTSKNQFSLKLSSVTAEDTAVYYCARTTRYWMSHILAYGMDYWGQGTLVTVSS

50 **SEQ ID NO:84**
CAGGTGCAATTGCAAGAAAGTGGTCCGGGCCTGGTGAAACCGGGCGAAACCCTGAGCCTGACCTGCACCG
TTTCCGGAGGTAGCATTTCTACTGGTTCTTATTATTGGAATTGGATTCGCCAGGCCCTGGGAAGGGTCT
CGAGTGGATTGGCGAGATCAATCATATGGGCATTACCTATTATAATCCGAGCCTGAAAGGCCGGGTGACC
ATTAGCGTTGATACTTCGAAAAACAGTTTAGCCTGAAACTGAGCAGCGTGACGGCGGAAGATACGGCCG
TGTATTATTGCGCGCGTACTACTCGTTATTGGATGTCTCATATTCTTGCTTATGGTATGGATTATTGGGG
CCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

SEQ ID NO:85

DIVLTQPPSVSGAPGQRTVITSCSGSSSNIGNHYVSWYQQLPGTAPKLLIYANTKRPSGVPDRFSGSKSGT
SASLAITGLQSEDEADYYCSSYDGSQSIVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO:86

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTGGCGCACCAGGTCAGCGTGTGACCATCTCGTGTAGCG
GCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGTCTTGGTACCAGCAGTTGCCCGGGACGGCGCCGAACT
TCTGATTTATGCTAATACTAAGCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACC
AGCGCGAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCTCTTCTTATGATG
GTTCTCAGTCTATTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTA

5

SEQ ID NO:87

EVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSISTGSYYWNWIRQAPGKGLEWIGEIQSPGYTFYNPSLKSRTV
ISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARTTRYWMSHILAYGMDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:88

GAGGTGCAATTGCAAGAAAGTGGTCCGGGCCTGGTGAAACCGGGCGAAACCCCTGAGCCTGACCTGCACCG
TTTCCGGAGGTAGCATTTCTACTGGTTCTTATTATTGGAATTGGATTGCGCAGGCCCTGGGAAGGGTCT
CGAGTGGATTGGCGAGATTACAGTCTCCTGGTTATACTTTTTATAATCCTTCTCTTAAGTCTCGGGTGACC
ATTAGCGTTGATACTTCGAAAAACAGTTTAGCCTGAAACTGAGCAGCGTGACGGCGGCGGATACGGCCG
TGTATTATTGCGCGCGTACTACTCGTTATTGGATGTCTCATATTCTTGCTTATGGTATGGATTATTGGGG
CCAAGGCACCCCTGGTGACGGTTAGCTCA

10

SEQ ID NO:89

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTGGCGCACCAGGTCAGCGTGTGACCATCTCGTGTAGCG
GCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGTCTTGGTACCAGCAGTTGCCCGGGACGGCGCCGAACT
TCTGATTTATGCTAATACTAAGCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACC
AGCGCGAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCTCTTCTTATGATG
GTTCTCAGTCTATTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTA

15

SEQ ID NO:90

EVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSISTGSYYWNWIRQAPGKGLEWIGEIIWHSGPFTYNPSLKSRTV
ISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARTTRYWMSHILAYGMDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:91

GAGGTGCAATTGCAAGAAAGTGGTCCGGGCCTGGTGAAACCGGGCGAAACCCCTGAGCCTGACCTGCACCG
TTTCCGGAGGTAGCATTTCTACTGGTTCTTATTATTGGAATTGGATTGCGCAGGCCCTGGGAAGGGTCT
CGAGTGGATTGGCGAGATTGGCATTCTGGTCTACTTTTTATAATCCTTCTCTTAAGTCTCGGGTGACC
ATTAGCGTTGATACTTCGAAAAACAGTTTAGCCTGAAACTGAGCAGCGTGACGGCGGCGGATACGGCCG
TGTATTATTGCGCGCGTACTACTCGTTATTGGATGTCTCATATTCTTGCTTATGGTATGGATTATTGGGG
CCAAGGCACCCCTGGTGACGGTTAGCTCA

20

SEQ ID NO:92

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTGGCGCACCAGGTCAGCGTGTGACCATCTCGTGTAGCG
GCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGTCTTGGTACCAGCAGTTGCCCGGGACGGCGCCGAACT
TCTGATTTATGCTAATACTAAGCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACC
AGCGCGAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCTCTTCTTATGATG
GTTCTCAGTCTATTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTA

SEQ ID NO:93

EVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSISTGSYYWNWIRQAPGKGLEWIGEIIHGHGFTFYNPSLKSRTV
ISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARTTRYWMSHILAYGMDYWGQGLVTVSS

25

SEQ ID NO:94

GAGGTGCAATTGCAAGAAAGTGGTCCGGGCCTGGTGAAACCGGGCGAAACCCTGAGCCTGACCTGCACCG
TTTCCGAGGTAGCATTTCTACTGGTTCTTATTATTGGAATTGGATTGCCAGGCCCTGGGAAGGGTCT
CGAGTGGATTGGCGAGATTCATGGTCATGGTTTTACTTTTTATAATCCTTCTCTTAAGTCTCGGGTGACC
ATTAGCGTTGATACTTCGAAAAACAGTTTAGCCTGAAACTGAGCAGCGTGACGGCGGCGGATACGGCCG
TGTATTATTGCGCGCTACTACTCGTTATTGGATGTCTCATATTCTTGCTTATGGTATGGATTATTGGG
CCAAGGCACCTGGTGACGGTTAGCTCA

SEQ ID NO:95

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCCTTCAGTGAGTGGCGCACCAGGTTCAGCGTGTGACCATCTCGTGTAGCG
GCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGTCTTGGTACCAGCAGTTGCCCGGGACGGCGCCGAAACT
TCTGATTTATGCTAATACTAAGCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACC
AGCGCGAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCTCTTCTTATGATG
GTTCTCAGTCTATTGTGTTTGGCGGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTA

5

SEQ ID NO:96

QVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSISTGSYYWNWIRQAPGKGLEWIGEINHMGITYYNP_{SL}KGRVT
ISVDTSKNQFSLKLSSVTAEDTAVYYCARTRYWMSHILAYGMDYWGQGT_{LV}TVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS_{GV}HTFPAVLQSSGLYSLSSVTV_{PSS}SLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT_{PP}VLDSG_{SS}FLYSKLT
VDKSRWOGN_{VF}SCSV_MHEALHNHYTOK_{SL}SLSPGK

SEQ ID NO:97

CAGGTGCAATTGCAAGAAAGTGGTCCGGGCTGGTGAAACCGGGCGAAACCTGAGCCTGACCTGCACCG
TTTCCGGAGGTAGCATTTCTACTGGTTCCTTATTATTGGAATTGGATTGCGCCAGGCCCTGGGAAGGGTCT
CGAGTGGATTGGCGAGATCAATCATATGGGCATTACCTATTATAATCCGAGCCTGAAAGGCCGGGTGACC
ATTAGCGTTGATACTTCGAAAAACCAGTTTAGCCTGAAACTGAGCAGCGTGACGGCGGAAGATACGGCCG
TGTATTATTGCGCGCTACTACTCGTTATTGGATGTCTCATATTCTTGCTTATGGTATGGATTATTGGGG
CCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTTCCCCCTGGCACCCCTCC
TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA
CGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCTCAG
ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC
GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACA
CATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAA
GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC
AGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTACGCTCCTCACCCTCCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA
GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG
CAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCC
TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA
GAACCACTACAAGACAGCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC
GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC
ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

10

SEQ ID NO:98

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTIISCSGSSSNIGNHYVSWYQQLPGTAPKLLIYANTKRPSGVPDRFSGSKSGT
SASLAITGLQSEDEADYYCSSYDGSQSIVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS
DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKNYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV
PTECS

15

SEQ ID NO:99

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTGGCGCACCAGGTCAGCGTGTGACCATCTCGTGTAGCG
GCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGTCTTGGTACCAGCAGTTGCCCGGGACGGCGCCGAAACT
TCTGATTTATGCTAATACTAAGCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACC
AGCGCGAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCTCTTCTTATGATG
GTTCTCAGTCTATTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTC
GGTCACTCTGTTCCTCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGT
GACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGA
CCACCACACCCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCA
GTGGAAGTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCC
CCTACAGAATGTTCA

SEQ ID NO:100

EVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFNSYAIISWVRQAPGQGLEWMGWINPFYIGETFYAQKFQGRVT
ITADESTSTAYMELSSLRSEDFAVYYCARAAYHPLVFDNWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSQSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

SEQ ID NO:101

GAGGTGCAGCTGGTGAGTCTGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGCTCCTCCGTCAAGGTGTCCTGCAAGG
CCTCCGGCGGCACCTTCAACTCCTACGCTATCTCTGGGTGCGCCAGGCTCCCGGACAGGGCCTGGAGTG
GATGGGCTGGATCAACCTTTCTACATCGGCGAGACATTCTACGCCCAGAAGTTCAGGGCAGAGTCACC
ATCACCGCCGACGAGTCCACCTCCACCGCCTACATGGAGCTGTCTCCCTGCGGTGAGAGCACCGCCG
TGTAATACTGCGCCAGGGCCGCTACACCCCTCTGGTGTTCGACAACCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGAC
CGTGTCCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCTCCGTGTTCCTCTGGCCCTTCCAGCAAGTCTACCTCCGGC
GGCACAGCTGCTCTGGGTGCTGCTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTTGAAGTCTG
GCGCCCTGACCTCTGGCGTGACACCTTCCCTGCGGTGCTGCAGTCTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTC
CGTGGTCACAGTGCCTTCAAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCC
AACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCCTGCCCTG
CTCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTCCTTCCAAAGCCCAAGGACACCCGTGATGATCTC
CCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGATCCTGAAGTGAAGTTCAATTGG
TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACC
GGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACAGGACTGGCTGAACGGCAAGAGTACAAGTGCAAAGTCTC
CAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCGAAAAGACAATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAG
GTGTACACCCCTGCCACCCAGCCGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGG
GCTTCTACCCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCAC
CCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCCAAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGG
CAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCTGTATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCC
TGTCCCTGTCTCCCGGCAAG

SEQ ID NO:102

CAGTCCGTGCTGACCCAGCCTCCTTCTGCCTCTGGCACCCCTGGCCAGAGAGTGACCATCTCCTGCTCTG
GCTCCTCCTCCAATATCGGCAACCACTACGTGAAGTGGTATCAGCAGCTGCCCGGAACCGCCCTAAGCT
GCTGATCTACCGGAACAACCACCGCCTTCCGGCGTGCCCGACCGGTTCTCCGGCTCCAAGTCTGGCACC
TCCGCCTCCCTGGCCATCTCTGGCCTGCAGTCAGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCCAGTCTCTGGGACT
ACTCCGGCTTCTCCACCGTGTTCCGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGTGGGACAGCCCTAAGGCTGCCCC
CAGCGTGACCCCTGTTCCCCCCCAGCAGCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCCACCCCTGGTGTGCCTGATC
AGCGACTTCTACCCAGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGG
AGACCACCAACCCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCGGA
GCAGTGAAGAGCCACAGGTCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGACCGTG
GCCCCAACCGAGTGCAGC

10

SEQ ID NO:103

EVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSISTGSYYWNWIRQAPGKGLEWIGEIQSPGYTFYNPSLKSRTV
ISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARTTRYWMSHILAYGMDYWGQGLVTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTCPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:104

GAGGTGCAATTGCAAGAAAGTGGTCCGGGCCTGGTGAAACCGGGCGAAACCCTGAGCCTGACCTGCACCG
TTTCCGGAGGTAGCATTTCTACTGGTTCTTATTATTGGAATTGGATTGCGCAGGCCCCCTGGGAAGGGTCT
CGAGTGGATTGGCGAGATTCACTCTCCTGGTTATACTTTTTATAATCCTTCTCTTAAGTCTCGGGTGACC
ATTAGCGTTGATACTTCGAAAAACAGTTTAGCCTGAAACTGAGCAGCGTGACGGCGGGCGGATACGGCCG
TGTATTATTGCGCGCGTACTACTCGTTATTGGATGTCCTCATATTCTTGCTTATGGTATGGATTATTGGGG
CCAAGGCACCCCTGGTGACGGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCC
TCCAAGAGCACCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA
CGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGG
ACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC
GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACA
CATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCAGCGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCCTTCCCAACCA
GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCT
GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGCGGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC
AGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA
GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG
CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCC
TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA
GAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC
GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC
5 ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO:105

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTGGCGCACCAGGTCAGCGTGTGACCATCTCGTGTAGCG
GCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGTCTTGGTACCAGCAGTTGCCCGGGACGGCGCCGAAACT
TCTGATTTATGCTAATACTAAGCGTCCCTCAGGCGTGCCGATCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACC
AGCGCGAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCTCTTCTTATGATG
GTTCTCAGTCTATTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCTTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTC
GGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGT
GACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGA
CCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCA
GTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCC
10 CCTACAGAATGTTCA

SEQ ID NO:106

SYAIH

SEQ ID NO:107

VISGEGSNTYYADSVKG

SEQ ID NO:108

VMIGYGFDY

SEQ ID NO:109

RASQSIFNYLN

SEQ ID NO:110

DSSTLQS

SEQ ID NO:111
LQYSGFLFT

SEQ ID NO:112

5 QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAIHWVRQAPGKGLEWVSVISGEGSNTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVMIGYGFDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:113

CAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGTAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTG
CTAGTGGCTTCACCTTCTCTAGCTACGCTATTCACTGGGTGAGACAGGCCCTGGTAAAGGCTGGAGTG
GGTGTCACTGATTAGCGCGAGGGCTCTAACACCTACTACGCCGATAGCGTGAAGGGCCGGTTCCTATC
TCTAGGGATAACTCTAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCGTCT
ACTACTGCGCTAGAGTGATGATCGGCTACGGCTTCGACTACTGGGGTCAGGGCACCTGGTACCGTGTC
TAGC

10 **SEQ ID NO:114**

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSI FNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDSSTLQSGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISSLQPEDFATYYCLQYSGFLFTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:115

GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTGTA
GAGCCTCTCAGTCTATCTTTAACTACCTGAAGTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTAAAGCCCCCTAAGCTGCT
GATCTACGACTCTAGCACCTGCAGTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCGAC
TTCACCCTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGCCTGCAGTATAGCGGCT
TCCTGTTCACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAGATTAAG

15 **SEQ ID NO:116**

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAIHWVRQAPGKGLEWVSVISGEGSNTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVMIGYGFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:117

CAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGTAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTG
CTAGTGGCTTCACCTTCTCTAGCTACGCTATTCACTGGGTGAGACAGGCCCTGGTAAAGGCCTGGAGTG
GGTGTGAGTGATTAGCGGCGAGGGCTCTAACACCTACTACGCCGATAGCGTGAAGGGCCGGTTCCTATC
TCTAGGGATAACTCTAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGCTC
ACTACTGCGCTAGAGTGATGATCGGCTACGGCTTCGACTACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTC
TAGCGCTAGCACTAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGCACA
GCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAAGTCTGGCGCCC
TGACCTCTGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGT
CACAGTGCCTTCAAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACC
AAGGTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCCTGCCCTGCTCCTG
AAGCTGTGCGGGCCCTTCTGTGTTCCCTGTCCCTCCAAAGCCCAAGGACACCCCTGATGATCTCCCGGAC
CCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGATCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTG
GACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGG
TGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTCTCCAACAA
GGCCCTGCCTGCCCCATCGAAAAGACAATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTGTAC
ACCCCTGCCACCCAGCCGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTCT
ACCCCTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACCCCTCC
TGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCCTGTACTCCAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAG
GGCAACGTGTTCTCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCC
TGTCTCCCGCAAG

SEQ ID NO:118

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI FNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDSSTLQSGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISSLQPEDFATYYCLQYSGFLFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGE

5

SEQ ID NO:119

GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTGTA
GAGCCTCTCAGTCTATCTTTAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTAAAGCCCCCTAAGCTGCT
GATCTACGACTCTAGCACCTGCAGTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCGAC
TTCACCTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGCCTGCAGTATAGCGGCT
TCCTGTTACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCAT
CTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTAC
CCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCA
CCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGA
GAAGCATAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC
AGGGGCGAGTGC

10

SEQ ID NO:120
TFSIS

SEQ ID NO:121
GIIPIFGTANYAQKFQG

15

SEQ ID NO:122
TIQSSGENKFYADSVKG

SEQ ID NO:123

GGYGGYYYFDY

SEQ ID NO:124
RASQSISNRLN

5

SEQ ID NO:125
KGSTLQS

SEQ ID NO:126
HQYSGLLFT

10

SEQ ID NO:127
QQHKVWLTT

15

SEQ ID NO:128
QQHYVWSTT

SEQ ID NO:129
QQHYQWLTT

20

SEQ ID NO:130

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTFSISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTI
TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYGGYYYFDYWGQGLTLTVSS

SEQ ID NO:131

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAG
CTAGTGGCGGCACCTTCAGCACCTTCTCTATTAGCTGGGTGACACAGGCCCCAGGTGAGGCCTGGAGTG
GATGGGCGGAATTATCCCTATCTTCGGCACCGCTAACTACGCTCAGAAATTTAGGGTAGAGTGACTATC
ACCGCCGACGAGTCTACTAGCACCGCCTATATGGAAGTGTCTAGCCTGAGATCAGAGGACACCGCCGTCT
ACTACTGCGCTAGGGCGGCTACGGCGGCTATTACTACTTCGACTACTGGGGTCAGGGCACCTGGTCAC
CGTGTCTAGC

25

SEQ ID NO:132

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISNRLNHWYQQKPGKAPKLLIYKGSTLQSGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISSLQPEDFATYYCQQHKVWLTTFGQGTKVEIK

30

SEQ ID NO:133

GATATTGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTGTA
GAGCCTCTCAGTCTATCTCTAATAGGCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTAAAGCCCCTAAGCTGCT
GATCTATAAGGGCTCTACCTGCAGTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCGAC
TTCACCTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCCAGGACTTCGCTACCTACTACTGTGAGCAGCACAAAGTGT
GGCTGACTACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAGATTAAG

SEQ ID NO:134

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTFSISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTI
TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYGGYYYFDYWGQGLTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKRVPEPKSCDKHTCTPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

35

SEQ ID NO:135

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAG
CTAGTGGCGGCACCTTCAGCACCTTCTCTATTAGCTGGGTGACAGAGCCCCAGGTGAGGCTGGAGTG
GATGGGCGGAATTATCCCTATCTTCGGCACCGCTAACTACGCTCAGAAATTTGAGGTAGAGTGACTATC
ACCGCCGACGAGTCTACTAGCACCGCCTATATGGAAGTGTCTAGCCTGAGATCAGAGGACACCGCCGTCT
ACTACTGCGCTAGGGGCGGCTACGGCGGCTATTACTACTTGCAGTACTGGGGTCAGGGCACCTGGTTCAC
CGTGTCTAGCGCTAGACTAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTCCAGCAAGTCTACCTCCGGC
GGCACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAAGTCTG
GCGCCCTGACCTCTGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCT
CGTGGTCACAGTGCCTTCAAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCC
AACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCCTGCCCTG
CTCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCTGTGTTCCCTCCAAAGCCCAAGGACACCTGATGATCTC
CCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGATCCTGAAGTGAAGTTCAATTGG
TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTACAAGTCCACCTACC
GGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTCTC
CAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCTATCGAAAAGACAATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAG
GTGTACACCCTGCCACCCAGCCGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGG
GCTTCTACCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACAACACTACAAGACCAC
CCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCCAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGG
CAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCC
TGTCCTGTCTCCCGCAAG

SEQ ID NO:136

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQISINRLNHYQQKPGKAPKLLIYKGSTLQSGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISSLQPEDFATYYCQQHKVWLTTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFN
RGE

SEQ ID NO:137

GATATTGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTACTATCACCTGTA
GAGCCTCTCAGTCTATCTCTAATAGGCTGAAGTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTAAAGCCCCTAAGCTGCT
GATCTATAAGGGCTCTACCTGCGAGTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCGAC
TTCACCTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGCACAAAGTGT
GGCTGACTACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGTTCAT
CTTCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTAC
CCCCGGGAGGCCAAGGTGCAAGTGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCA
CCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCTGAGCAAGGCCGACTACGA
GAAGCATAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC
AGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO:138

QVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAIHWVRQAPGKLEWVSTIQSSGENKFYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVMIGYGFYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:139

CAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGTAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTG
CTAGTGGCTTCACCTTCTCTAGCTACGCTATTCAGTGGGTGAGACAGGCCCTGGTAAAGCCTGGAGTG
GGTCAGCACTATTCAGTCTAGCGGCGAGAACAAGTTCTACGCCGATAGCGTGAAGGGCCGGTTCAGTATC
TCTAGGGATAACTCTAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTCT
ACTACTGCGCTAGAGTGATGATCGGCTACGGCTTCGACTACTGGGGTCAGGGCACCTGGTCACCGTGTC
TAGC

SEQ ID NO:140

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSI FNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDSSTLQSGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISLQPEDFATYYCHQYSGLLFTFGQGTKVEIK

5

SEQ ID NO:141

GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTGTA
GAGCCTCTCAGTCTATCTTTAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTAAAGCCCTAAGCTGCT
GATCTACGACTCTAGCACCTGCAGTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCGAC
TTCACCCTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCACCAGTATAGCGGCC
TGCTGTTCACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAGATTAAG

SEQ ID NO:142

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAIHWVRQAPGKGLEWVSTIQSSGENKFYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVMIGYGFQYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

SEQ ID NO:143

CAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGTAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTG
CTAGTGGCTTACCTTCTCTAGCTACGCTATTCACTGGGTGAGACAGGCCCTGGTAAAGGCCTGGAGTG
GGTCAGCACTATTCACTCTAGCGGCGAGAACAAGTTCTACGCCGATAGCGTGAAGGGCCGGTTCACTATC
TCTAGGGATAACTCTAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTCT
ACTACTGCGCTAGAGTGATGATCGGCTACGGCTTCGACTACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTC
TAGCGCTAGCACTAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGCACA
GCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTTGGAACTCTGGCGCCC
TGACCTCTGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGT
CACAGTGCCTTCAAGCAGCCTGGGCGACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACC
AAGGTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCCTGCCCTGCTCCTG
AAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCCCTGTTCCCTCCAAAGCCCAAGGACACCCCTGATGATCTCCCGGAC
CCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGATCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTG
GACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGG
TGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTCTCCAACAA
GGCCCTGCCTGCCCCATCGAAAAGACAATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAGGTGTAC
ACCCTGCCACCCAGCCGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCT
ACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACCCCTCC
TGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCCAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAG
GGCAACGTGTTCTCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCCTACACCCAGAAGTCCCTGTCCC
TGTCTCCCGGCAAG

SEQ ID NO:144

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSI FNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDSSTLQSGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISSLQPEDFATYYCHQYSGLLFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGE

5

SEQ ID NO:145

GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGAATCACCTGTA
GAGCCTCTCAGTCTATCTTTAACTACCTGAACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTAAAGCCCCTAAGCTGCT
GATCTACGACTCTAGCACCCCTGCAGTCAGGCGTGCCTCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCAGAC
TTCACCCTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAACAGTATAGCGGCC
TGCTGTTACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGTTTCAT
CTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTAC
CCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCA
CCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCTGAGCAAGGCCGACTACGA
GAAGCATAAGGTGTACGCCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC
AGGGGCGAGTGC

10

SEQ ID NO:146

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAG
CTAGTGGCGGCACCTTCAGCACCTTCTCTATTAGCTGGGTGACAGAGCCCCAGGTGAGGCCTGGAGTG
GATGGGCGGAATTATCCCTATCTTCGGCACCGCTAACTACGCTCAGAAATTTAGGGTAGAGTGACTATC
ACCGCCGACGAGTCTACTAGCACCGCCTATATGGAAGTGTCTAGCCTGAGATCAGAGGACACCGCCGTCT
ACTACTGCGCTAGGGGCGGCTACGGCGGCTATTACTACTTCGACTACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCAC
CGTGTCTAGC

SEQ ID NO:147

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI SNRLNHWYQQKPGKAPKLLIYKGSTLQSGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISLQPEDFATYYCQQHYVWSTTFGQGTKVEIK

5

SEQ ID NO:148

GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTGTA
GAGCCTCTCAGTCTATCTCTAATAGGCTGAAGTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTAAAGCCCCTAAGCTGCT
GATCTATAAGGGCTCTACCCTGCAGTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCGAC
TTCACCCCTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTGTCAGCAGCACTACGTGT
GGTCTACTACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAGATTAAG

SEQ ID NO:149

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAG
CTAGTGGCGGCACCTTCAGCACCTTCTCTATTAGCTGGGTGACAGAGCCCCAGGTGAGGCCTGGAGTG
GATGGGCGGAATTATCCCTATCTTCGGCACCGCTAACTACGCTCAGAAATTTAGGGTAGAGTGACTATC
ACCGCCGACGAGTCTACTAGCACCGCCTATATGGAAGTGTCTAGCCTGAGATCAGAGGACACCGCCGTCT
ACTACTGCGCTAGGGGCGGCTACGGCGGCTATTACTACTTCGACTACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCAC
CGTGTCTAGCGCTAGCACTAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTCCAGCAAGTCTACCTCCGGC
GGCACAGCTGCTCTGGGTGCGCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAAGTCTG
GCGCCCTGACCTCTGGCGTGACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCTC
CGTGGTCACAGTGCCTTCAAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCC
AACACCAAGGTGGACAAGCGGTGGAGCCTAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCCTGCCCTG
CTCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCCCTGTTCCTCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTC
CCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGATCCTGAAGTGAAGTTCAATTGG
TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACC
GGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTCTC
CAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCTATCGAAAAGACAATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAG
GTGTACACCCTGCCACCCAGCCGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGG
GCTTCTACCCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACAACATAAGACCAC
CCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTGTACTCCAAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGG
CAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCC
TGTCCCTGTCTCCCGCAAG

10

SEQ ID NO:150

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI SNRLNHWYQQKPGKAPKLLIYKGSTLQSGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISLQPEDFATYYCQQHYVWSTTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGE

SEQ ID NO:151

GATATTGAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTGTA
GAGCCTCTCAGTCTATCTCTAATAGGCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTAAAGCCCCCTAAGCTGCT
GATCTATAAGGGCTCTACCCTGCAGTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCAG
TTCACCCTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCCAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGCACTACGTGT
GGTCTACTACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCAT
CTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTAC
CCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCA
CCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGA
GAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC
AGGGGCGAGTGC

5 **SEQ ID NO:152**

CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAAGTGAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTTAGCTGCAAAG
CATCCGGAGGGACGTTTTCTACTTTCTCTATCTCTTGGGTGCGCCAGGCCCGGGCCAGGGCCTCGAGTG
GATGGGCGGTATCATCCCGATCTTCGGCACTGCGAACTACGCCCAGAAATTTAGGGCCGGGTGACCATT
ACCGCCGATGAAAGCACCAGCACCGCCTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACGGCCGTGT
ATTATTGCGCGCGTGGTGGTTACGGTGGTTACTACTACTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGAC
TGTTAGCTCA

SEQ ID NO:153

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIISNRLNWTQQKPGKAPKLLIYKGSTLQSGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYQWLTTFGQGTKVEIK

10

SEQ ID NO:154

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCA
GAGCCAGCCAGTCTATTTCTAACCGTCTGAACTGGTACCAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAACTATT
AATCTACAAAGGTTCTACTCTGCAAAGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCAGT
TTCACCCTGACCATTAGCTCTCTGCAACCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAGCATTACCAGT
GGCTGACTACCTTTGGCCAGGGCACGAAAGTTGAAATTAAA

SEQ ID NO:155

CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAAGTGAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTTAGCTGCAAAG
CATCCGGAGGGACGTTTTCTACTTTCTCTATCTCTTGGGTGCGCCAGGCCCCGGGCCAGGGCCTCGAGTG
GATGGGCGGTATCATCCCGATCTTCGGCACTGCGAACTACGCCCAGAAATTTAGGGCCGGGTGACCATT
ACCGCCGATGAAAGCACCAGCACCAGCCTATATGGAAGTACGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACGGCCGTGT
ATTATTGCGCGCGTGGTGGTTACGGTGGTTACTACTACTTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGAC
TGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCTCAAGAGCACCTCTGGG
GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAG
GCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG
CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC
AACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCAG
CACCTGAAGCAGCGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTC
CCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGG
TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACC
GGGTGGTCAGCGTCTCTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTC
CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAG
GTGTACACCCTGCCCCCATCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAG
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCAC
GCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC
TCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO:156

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQISINRLNHYQQKPGKAPKLLIYKGSTLQSGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYQWLTTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGE

5

SEQ ID NO:157

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCA
GAGCCAGCCAGTCTATTTCTAACCGTCTGAACTGGTACCAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTATT
AATCTACAAAGGTTCTACTCTGCAAAGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCGAT
TTCACCTGACCATTAGCTCTCTGCAACCGGAAGACTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAGCATTACCAGT
GGCTGACTACCTTTGGCCAGGGCACGAAAGTTGAAATTAACGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCAT
CTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTCTAC
CCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTCA
CCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGA
GAAGCACAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC
CGGGGCGAGTGT

SEQ ID NO:158

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAIISWVRQAPGQGLEWMGNIIPITGQTYIAQKFQGRVTI
TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAHYHPLVFDNWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKRVKPKCDKHTCTPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

SEQ ID NO:159

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAG
CTAGTGGCGGCACCTTCTCTAGCTACGCTATTAGCTGGGTGACACAGGCCCCAGGTGAGGGCTGGAGTG
GATGGGCAATATTATCCCTATCACCGGTGACCTACTACGCTCAGAAATTTAGGGTAGAGTGACTATC
ACCGCCGACGAGTCTACTAGCACCGCCTATATGGAAGTGTCTAGCCTGAGATCAGAGGACACCGCCGTCT
ACTACTGCGCTAGAGCCGCCTATCACCCCTGGTGTTCGATAACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGT
GTCTAGCGCTAGCACTAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGC
ACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAACTCTGGCG
CCCTGACCTCTGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGT
GGTCACAGTGCCTTCAAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAAC
ACCAAGTGAGACAAGCGGTGGAGCCTAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCCTGCCCTGCTC
CTGAAGTGTCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCCCTGTTCCCTCCAAAGCCCAAGGACACCCCTGATGATCTCCCG
GACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGATCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTAC
GTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGG
TGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTCTCCAA
CAAGGCCCTGCCTGCCCTATCGAAAAGACAATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTG
TACACCCCTGCCACCCAGCCGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCT
TCTACCCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGCCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACCC
TCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCCAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAG
CAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCAGAAAGTCCCTGT
CCCTGTCTCCCGGCAAG

SEQ ID NO:160

QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGNHYVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNHRPSGVPDRFSGSKSGT
SASLAISGLQSEDEADYQCQSWDYSGFSTVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLI
SDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV
APTECS

SEQ ID NO:161

CAGTCAGTCTGACTCAGCCCCCTAGCGCTAGTGGCACCCCTGGTCAGAGAGTGACTATTAGCTGTAGCG
GCTCTAGCTCTAATATCGGTAATCACTACGTGAACTGGTATCAGCAGCTGCCCGGCACCGCCCCCTAAGCT
GCTGATCTATAGAAACAATCACCGGCCTAGCGGCGTGCCCGATAGTTTAGCGGATCTAAGTCAGGGACT
AGCGCTAGTCTGGCTATTAGCGGCCTGCAGTCAGAGGACGAGGCCGACTACTACTGTGAGTCTGGGACT
ATAGCGGCTTTAGCACCGTGTTCGGCGGAGGCACTAAGCTGACCGTGCTGGGTGAGCCTAAGGCTGCCCC
CAGCGTGACCCCTGTTCCCCCCCAGCAGCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATC
AGCGACTTCTACCCAGGCGCGGTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGG
AGACCACCACCCCCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGA
GCAGTGGAAGAGCCACAGGTCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGACCGTG
GCCCCAACCGAGTGCAGC

SEQ ID NO:162

GGSISTGSY

SEQ ID NO:163

QSPGY

SEQ ID NO:164

TTRYWMSHILAYGMDY

SEQ ID NO:165

SSSNIGNHY

SEQ ID NO:166

ANT

SEQ ID NO:167

YDGSQSI

SEQ ID NO:168

EVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSISTGSIYWNWIRQAPGKGLEWIGEIWHSGPTFYNP SLKSRVT
ISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARTTRYWMSHILAYGMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTCTPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:169

GAGGTGCAATTGCAAGAAAGTGGTCCGGGCCTGGTGAAACCGGGCGAAACCCTGAGCCTGACCTGCACCG
TTTCCGGAGGTAGCATTTCTACTGGTTCTTATTATTGGAATTGGATTGCCAGGCCCTGGGAAGGGTCT
CGAGTGGATTGGCGAGATTTGGCATTCTGGTCCTACTTTTTATAATCCTTCTCTTAAGTCTCGGGTGACC
ATTAGCGTTGATACTTCGAAAAACCAGTTTAGCCTGAACTGAGCAGCGTGACGGCGGCGGATACGGCCG
TGTATTATTGCGCGCGTACTACTCGTTATTGGATGTCTCATATTCTTGCTTATGGTATGGATTATTGGGG
CCAAGGCACCCCTGGTGACGGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCC
TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA
CGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGG
ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC
GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACA
CATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCAGCGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAA
GGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCT
GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC
AGTACAACAGCACGTACCGGTGGTCAAGCGTCCCTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA
GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG
CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCC
TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA
GAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACC
GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC
5 ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO:170

DIVLTQPPSVSGAPGQRTVISCSSSNIGNHYVSWYQQLPGTAPKLLIYANTKRPSGVPDRFSGSKSGT
SASLAITGLQSEDEADYYCSSYDGSQSIVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS
DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV
PTECS

10 SEQ ID NO:171

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTGGCGCACCAGGTCAGCGTGTGACCATCTCGTGTAGCG
GCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGTCTTGGTACCAGCAGTTGCCCGGGACGGCGCCGAAACT
TCTGATTTATGCTAATACTAAGCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACC
AGCGCGAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCTCTTCTTATGATG
GTTCTCAGTCTATTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTAGGTACGCCAAGGCTGCCCCCTC
GGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGT
GACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGA
CCACCACACCCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCA
GTGGAAGTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCC
CCTACAGAATGTTCA

SEQ ID NO:172

EVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSISTGSYYWNWIRQAPGKGLEWIGEIHGHGFTFYNP SLKSRVT
ISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARTTRYWMSHILAYGMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTCTPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

SEQ ID NO:173

GAGGTGCAATTGCAAGAAAGTGGTCCGGGCCTGGTGAAACCGGGCGAAACCCTGAGCCTGACCTGCACCG
TTTCCGGAGGTAGCATTTCTACTGGTTCTTATTATTGGAATTGGATTGCCAGGCCCCCTGGGAAGGGTCT
CGAGTGGATTGGCGAGATTGATGGTCATGGTTTTACTTTTTATAATCCTTCTCTTAAGTCTCGGGTGACC
ATTAGCGTTGATACTTCGAAAAACAGTTTTAGCCTGAAACTGAGCAGCGTGACGGCGGCGGATACGGCCG
TGTATTATTGCGCGCGTACTACTCGTTATTGGATGTCATATTCTTGCTTATGGTATGGATTATTGGGG
CCAAGGCACCCCTGGTGACGGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCC
TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA
CGGTGTCGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCCTCAGG
ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC
GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACA
CATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCAGCGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAA
GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC
AGTACAACAGCACGTACCGGTGGTCAGCGTCCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA
GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG
CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCC
TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA
GAACAACATAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC
GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC
ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

10

SEQ ID NO:174

DIVLTQPPSVSGAPGQRTVITSCSGSSSNIGNHYVSWYQQLPGTAPKLLIYANTKRPSGVPDRFSGSKSGT
SASLAITGLQSEDEADYYCSSYDGSQSIVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS
DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV
PTECS

SEQ ID NO:175

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTGGCGCACCAGGTCAGCGTGTGACCATCTCGTGTAGCG
GCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGTCTTGGTACCAGCAGTTGCCCGGGACGGCGCCGAAACT
TCTGATTTATGCTAATACTAAGCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACC
AGCGCGAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCTCTTCTTATGATG
GTTCTCAGTCTATTGTGTTTGGCGGGCAGCAAGTTAACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTC
GGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGT
GACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGA
CCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCA
GTGGAAGTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCC

5 CCTACAGAATGTTCA

SEQ ID NO:176

EVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFNSYAI SWVRQAPGQGLEWMGNIIPHYGFAYYAQKFQGRVTI
TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAYHPLVFDNWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

10 **SEQ ID NO:177**

GAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAG
CCTCCGGAGGCACTTTTAATCTTATGCTATTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCGAGGCTCTCGAGTG
GATGGGCAATATTATTCCTCATTATGGTTTTGCTTATTATGCTCAGAAGTTTCAGGGTCGGGTGACCATT
ACCGCGGATGAAAGCACCAGCACCAGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGT
ATTATTGCGCGCGTGCTGCTTATCATCTCTTGTTTTTGATAATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGT
TAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCG
CCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT
GGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC
ACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCAC
CTGAAGCAGCGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCCG
GACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
GTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGG
TGGTCAGCGTCTCACCCTGTCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA
CAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG
TACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT

TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCC
TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG
CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT
CCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO:178

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTI SCSSSSNIGNHYVINWYQQLPGTAPKLLIYRNNHRPSGVPDRFSGSKSGT
SASLAITGLQSEDEADYYCQSWDYSGFSTVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLII
SDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKNYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV
APTECS

5

SEQ ID NO:179

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTGGCGCACCAGGTCAGCGTGTGACCATCTCGTGTAGCG
GCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGAATTGGTACCAGCAGTTGCCCGGGACGGCGCCGAAACT
TCTGATTATATCGTAATAATCATCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACC
AGCGCGAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCCAGTCTTGGGATT
ATTCTGGTTTTTCTACTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCC
CTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATA
AGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGG
AGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGA
GCAGTGGAAGTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTG
GCCCCCTACAGAATGTTCA

SEQ ID NO:180

EVQLVQSGAEVVKPGSSVKVSKKASGGTFNSYAI SWVRQAPGQGLEWMGNIIPYSGFAYYAQKFQGRVTI
TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAYHPLVFDNWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

SEQ ID NO:181

GAGGTGCAATTGGTTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAG
CCTCCGGAGGCACTTTTAAATCTTATGCTATTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTG
GATGGGCAATATTATTCCTTATCTGGTTTTGCTTATTATGCTCAGAAGTTTCAGGGTCGGGTGACCATT
ACCGCGGATGAAAGCACCAGCACCGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGT
ATTATTGCGCGCGTGCTGCTTATCATCTCTTGTTTTTGATAATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGT
TAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCAAGAGCACCTCTGGGGGC
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAGTCAAGCG
CCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT
GGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC
ACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCAC
CTGAAGCAGCGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG
GACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCGTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGG
TGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA
CAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG
TACACCTTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT
TCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAGCAAACTACAAGACCACGCC
TCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG
CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT
CCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO:182

DIVLTQPPSVSGAPGQRTVISCSSSSNIGNHYVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNHRPSGVPDRFSGSKSGT
SASLAITGLQSEDEADYYCQSWDYSGFSTVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLI
SDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV
APTECS

5

SEQ ID NO:183

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTGGCGCACCAAGGTCAGCGTGTGACCATCTCGTGTAGCG
GCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGAATTGGTACCAGCAGTTGCCCGGGACGGCGCCGAAACT
TCTGATTTATCGTAATAATCATCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACC
AGCGCGAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCCAGTCTTGGGATT
ATTCTGGTTTTTCTACTGTGTTTGGCGGGCGGCACGAAGTTAACCCTCCTAGGTGAGCCCAAGGCTGCCCC
CTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATA
AGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGG
AGACCACCACACCCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGA
GCAGTGAAGTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTG
GCCCCACAGAATGTTCA

10

SEQ ID NO:184

GGSISTGSY

SEQ ID NO:185

NHMG1

15

SEQ ID NO:186

TTRYWMSHILAYGMDY

SEQ ID NO:187

SSSNIGNHY

20

SEQ ID NO:188

ANT

25

SEQ ID NO:189

YDGSQSI

SEQ ID NO:190
 GGSISTGSY

5 **SEQ ID NO:191**
 WHSGP

SEQ ID NO:192
 TTRYWMSHILAYGMDY

10 **SEQ ID NO:193**
 SSSNIGNHY

SEQ ID NO:194
 ANT

15 **SEQ ID NO:195**
 YDGSQSI

SEQ ID NO:196
 EIHGHGFTFYNPSLKS

20 **SEQ ID NO:197**
 GGSISTGSY

25 **SEQ ID NO:198**
 HGHGF

SEQ ID NO:199
 TTRYWMSHILAYGMDY

30 **SEQ ID NO:200**
 SSSNIGNHY

SEQ ID NO:201
 ANT

35 **SEQ ID NO:202**
 YDGSQSI

40 **SEQ ID NO:203**
 GGTFNSY

SEQ ID NO:204
 IPIYGT

45 **SEQ ID NO:205**
 AAYHPLVFDN

SEQ ID NO:206
 SSSNIGNHY

50 **SEQ ID NO:207**
 RNN

55 **SEQ ID NO:208**
 WDYSGFST

SEQ ID NO:209
 GGTFNSY

60 **SEQ ID NO:210**
 NPFYIGE

SEQ ID NO:211

AAYHPLVFDN

SEQ ID NO:212
SSSNIGNHY

5 **SEQ ID NO:213**
RNN

10 **SEQ ID NO:214**
WDYSGFST

SEQ ID NO:215
GGTFNSY

15 **SEQ ID NO:216**
IPHYGF

SEQ ID NO:217
AAYHPLVFDN

20 **SEQ ID NO:218**
SSSNIGNHY

SEQ ID NO:219
RNN

25 **SEQ ID NO:220**
WDYSGFST

30 **SEQ ID NO:221**
GGTFNSY

SEQ ID NO:222
IPYSGF

35 **SEQ ID NO:223**
AAYHPLVFDN

SEQ ID NO:224
SSSNIGNHY

40 **SEQ ID NO:225**
RNN

45 **SEQ ID NO:226**
WDYSGFST

SEQ ID NO:227
GGTFNSY

50 **SEQ ID NO:228**
NPFYIGE

SEQ ID NO:229
AAYHPLVFDN

55 **SEQ ID NO:230**
SSSNIGNHY

60 **SEQ ID NO:231**
RNN

SEQ ID NO:232
WDYSGFST

SEQ ID NO:233
GGTFNSY
5 **SEQ ID NO:234**
IPMTGQ
SEQ ID NO:235
AAYHPLVFDN
10 **SEQ ID NO:236**
SSSNIGNHY
SEQ ID NO:237
15 RNN
SEQ ID NO:238
WDYSGFST
20 **SEQ ID NO:239**
NIIPITGQTYA QKFQG
SEQ ID NO:240
GGTFSTF
25 **SEQ ID NO:241**
IPIFGT
SEQ ID NO:242
30 GGYGGYYFDY
SEQ ID NO:243
SQSISNR
35 **SEQ ID NO:244**
KGS
SEQ ID NO:245
40 HKVWLT
SEQ ID NO:246
GGTFSTF
SEQ ID NO:247
45 IPIFGT
SEQ ID NO:248
GGYGGYYFDY
50 **SEQ ID NO:249**
SQSISNR
SEQ ID NO:250
55 KGS
SEQ ID NO:251
HYVWST
SEQ ID NO:252
60 GGTFTF
SEQ ID NO:253
IPIFGT

	SEQ ID NO:254 GGYGGYYFDY
5	SEQ ID NO:255 SQSISNR
	SEQ ID NO:256 KGS
10	SEQ ID NO:257 HYQWLT
	SEQ ID NO:258 GFTFSSY
15	SEQ ID NO:259 QSSGEN
20	SEQ ID NO:260 VMIGYGFDY
	SEQ ID NO:261 SQSIFNY
25	SEQ ID NO:262 DSS
	SEQ ID NO:263 YSGLLF

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo completamente humano aislado o quimérico o un fragmento del mismo que se une específicamente a IL-18, pero que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18, en donde el anticuerpo aislado o fragmento del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 14 y un dominio variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 16.
2. El anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo aislado o fragmento del mismo es un anticuerpo completamente humano aislado o fragmento del mismo.
3. El anticuerpo aislado o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo aislado o fragmento del mismo es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un Fab, un Fab', un F(ab')₂ y un scFv.
4. El anticuerpo aislado o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo aislado o fragmento del mismo comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 43 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 45.
5. Un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo aislado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende:
 SEQ ID NO: 15 o una secuencia al menos 90% idéntica a la misma; o
 SEQ ID NO: 17 o una secuencia al menos 90% idéntica a la misma; o
 SEQ ID NO: 15 o una secuencia al menos 90% idéntica a la misma; y SEQ ID NO: 17 o una secuencia al menos 90% idéntica a la misma; o
 SEQ ID NO: 44 o una secuencia al menos 90% idéntica a la misma; o
 SEQ ID NO: 46 o una secuencia al menos 90% idéntica a la misma; o
 SEQ ID NO: 44 o una secuencia al menos 90% idéntica a la misma; y SEQ ID NO: 46 o una secuencia al menos 90% idéntica a la misma.
7. Un vector de clonación o expresión que comprende uno o más polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6.
8. Una célula huésped que comprende uno o más vectores de clonación o expresión de acuerdo con la reivindicación 7.
9. Una célula huésped transformada o transfectada de manera estable que comprende uno o más polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6.
10. Un método para producir un anticuerpo completamente humano aislado o quimérico o un fragmento del mismo que se une específicamente a IL-18, pero que no se une al complejo de proteína de unión a IL-18/IL-18, método que comprende cultivar una célula huésped de la reivindicación 8 en condiciones adecuadas para producir el anticuerpo aislado o fragmento del mismo.
11. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo aislado o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un soporte farmacéutico, en donde la composición farmacéutica comprende opcionalmente un segundo compuesto terapéutico.
12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11 en forma administrable por vía intravenosa, inhalable o por vía subcutánea.
13. El anticuerpo aislado o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la composición farmacéutica de las reivindicaciones 11 o 12 para uso en terapia.
14. El anticuerpo aislado o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la composición farmacéutica de las reivindicaciones 11 o 12 para uso en el tratamiento y/o la prevención de la sarcoidosis, en particular la sarcoidosis pulmonar, la linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH), la linfohistiocitosis hemofagocítica familiar (FHL) y otros síndromes de inmunodeficiencia, artritis de células gigantes (GCA), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedad de Still de inicio en adultos (AOSD), artritis idiopática juvenil sistémica (SJIA), asma grave, uveítis, atrofia geográfica, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 o aterosclerosis y cualquier combinación de las mismas en un paciente mamífero.

	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3
MOR9464	SYAIS (SEQ ID NO:3)	NIIP-MTGQTYAQQFQG (SEQ ID NO:9)	AAHPLVFDN (SEQ ID NO: 5)
MOR9464N30K	SYAIS (SEQ ID NO:3)	NIIP-MTGQTYAQQFQG (SEQ ID NO:9)	AAHPLVFDN (SEQ ID NO: 5)
MOR10222N30SM54I	SYAIS (SEQ ID NO:3)	NIIP-ITGQTYAQQFQG (SEQ ID NO:13)	AAHPLVFDN (SEQ ID NO: 5)
MOR8775	SYAIS (SEQ ID NO:3)	GIIP-IYGTANYAQQFQG (SEQ ID NO:4)	AAHPLVFDN (SEQ ID NO: 5)
MOR9465	SYAIS (SEQ ID NO:3)	NIIP-HYGFAYYAQQFQG (SEQ ID NO:11)	AAHPLVFDN (SEQ ID NO: 5)
MOR9466	SYAIS (SEQ ID NO:3)	NIIP-YSGFAYYAQQFQG (SEQ ID NO:12)	AAHPLVFDN (SEQ ID NO: 5)
MOR10222	SYAIS (SEQ ID NO:3)	NIIP-MTGQTYAQQFQG (SEQ ID NO:9)	AAHPLVFDN (SEQ ID NO: 5)
MOR9441	SYAIS (SEQ ID NO:3)	WINPFYIGTTFYAQQFQG (SEQ ID NO:10)	AAHPLVFDN (SEQ ID NO: 5)
MOR10579	SYAIS (SEQ ID NO:3)	WINPFYIGTTFYAQQFQG (SEQ ID NO:10)	AAHPLVFDN (SEQ ID NO: 5)
MOR13363	SYAIIH (SEQ ID NO:106)	VISGEGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:107)	VMIGYGFY (SEQ ID NO:108)
MOR13361	SYAIIH (SEQ ID NO:106)	TIQSSGENKFYADSVKG (SEQ ID NO:122)	VMIGYGFY (SEQ ID NO:108)
MOR13341	TFSIS (SEQ ID NO:120)	GIIP-IFGTANYAQQFQG (SEQ ID NO:121)	GGYGGYYFYD (SEQ ID NO:123)
MOR13342	TFSIS (SEQ ID NO:120)	GIIP-IFGTANYAQQFQG (SEQ ID NO:121)	GGYGGYYFYD (SEQ ID NO:123)
MOR13347	TFSIS (SEQ ID NO:120)	GIIP-IFGTANYAQQFQG (SEQ ID NO:121)	GGYGGYYFYD (SEQ ID NO:123)
MOR8776	TGSYYWN (SEQ ID NO:74)	EINHMGITYYNPSLKG (SEQ ID NO:75)	TTRYWMSHILAYGMDY (SEQ ID NO: 79)
MOR10497	TGSYYWN (SEQ ID NO:74)	EIQSPGYTFYNPSLKS (SEQ ID NO:78)	TTRYWMSHILAYGMDY (SEQ ID NO: 79)
MOR10501	TGSYYWN (SEQ ID NO:74)	EIWHSGTTFYNPSLKS (SEQ ID NO:76)	TTRYWMSHILAYGMDY (SEQ ID NO: 79)
MOR10502	TGSYYWN (SEQ ID NO:74)	EIHGHGTFTFYNPSLKS (SEQ ID NO:77)	TTRYWMSHILAYGMDY (SEQ ID NO: 79)

Figure 1

	L-CDR1		L-CDR2		L-CDR3
MOR9464	SGSSSNIGNHYVN	(SEQ ID NO: 6)	RNNHRPS	(SEQ ID NO: 7)	QSWDYSGFSTV (SEQ ID NO: 8)
MOR9464N30K	SGSSSNIGNHYVN	(SEQ ID NO: 6)	RNNHRPS	(SEQ ID NO: 7)	QSWDYSGFSTV (SEQ ID NO: 8)
MOR10222N30SM54I	SGSSSNIGNHYVN	(SEQ ID NO: 6)	RNNHRPS	(SEQ ID NO: 7)	QSWDYSGFSTV (SEQ ID NO: 8)
MOR8775	SGSSSNIGNHYVN	(SEQ ID NO: 6)	RNNHRPS	(SEQ ID NO: 7)	QSWDYSGFSTV (SEQ ID NO: 8)
MOR9465	SGSSSNIGNHYVN	(SEQ ID NO: 6)	RNNHRPS	(SEQ ID NO: 7)	QSWDYSGFSTV (SEQ ID NO: 8)
MOR9466	SGSSSNIGNHYVN	(SEQ ID NO: 6)	RNNHRPS	(SEQ ID NO: 7)	QSWDYSGFSTV (SEQ ID NO: 8)
MOR10579	SGSSSNIGNHYVN	(SEQ ID NO: 6)	RNNHRPS	(SEQ ID NO: 7)	QSWDYSGFSTV (SEQ ID NO: 8)
MOR10222	SGSSSNIGNHYVN	(SEQ ID NO: 6)	RNNHRPS	(SEQ ID NO: 7)	QSWDYSGFSTV (SEQ ID NO: 8)
MOR9441	SGSSSNIGNHYVN	(SEQ ID NO: 6)	RNNHRPS	(SEQ ID NO: 7)	QSWDYSGFSTV (SEQ ID NO: 8)
MOR13363	RASQSIFFNYLN	(SEQ ID NO: 109)	DSSTLQS	(SEQ ID NO: 110)	LQYSGFLFT (SEQ ID NO: 111)
MOR13361	RASQSIFFNYLN	(SEQ ID NO: 109)	DSSTLQS	(SEQ ID NO: 110)	HQYSGLLFT (SEQ ID NO: 126)
MOR13341	RASQSIISNRLN	(SEQ ID NO: 124)	KGSTLQS	(SEQ ID NO: 125)	QQHKVWLTT (SEQ ID NO: 127)
MOR13342	RASQSIISNRLN	(SEQ ID NO: 124)	KGSTLQS	(SEQ ID NO: 125)	QQHYVWSTT (SEQ ID NO: 128)
MOR13347	RASQSIISNRLN	(SEQ ID NO: 124)	KGSTLQS	(SEQ ID NO: 125)	QQHYQWLTT (SEQ ID NO: 129)
MOR8776	SGSSSNIGNHYVS	(SEQ ID NO: 80)	ANTKRPS	(SEQ ID NO: 81)	SSYDGSQSIV (SEQ ID NO: 82)
MOR10497	SGSSSNIGNHYVS	(SEQ ID NO: 80)	ANTKRPS	(SEQ ID NO: 81)	SSYDGSQSIV (SEQ ID NO: 82)
MOR10501	SGSSSNIGNHYVS	(SEQ ID NO: 80)	ANTKRPS	(SEQ ID NO: 81)	SSYDGSQSIV (SEQ ID NO: 82)
MOR10502	SGSSSNIGNHYVS	(SEQ ID NO: 80)	ANTKRPS	(SEQ ID NO: 81)	SSYDGSQSIV (SEQ ID NO: 82)

Figura 2

Figura 3(A)

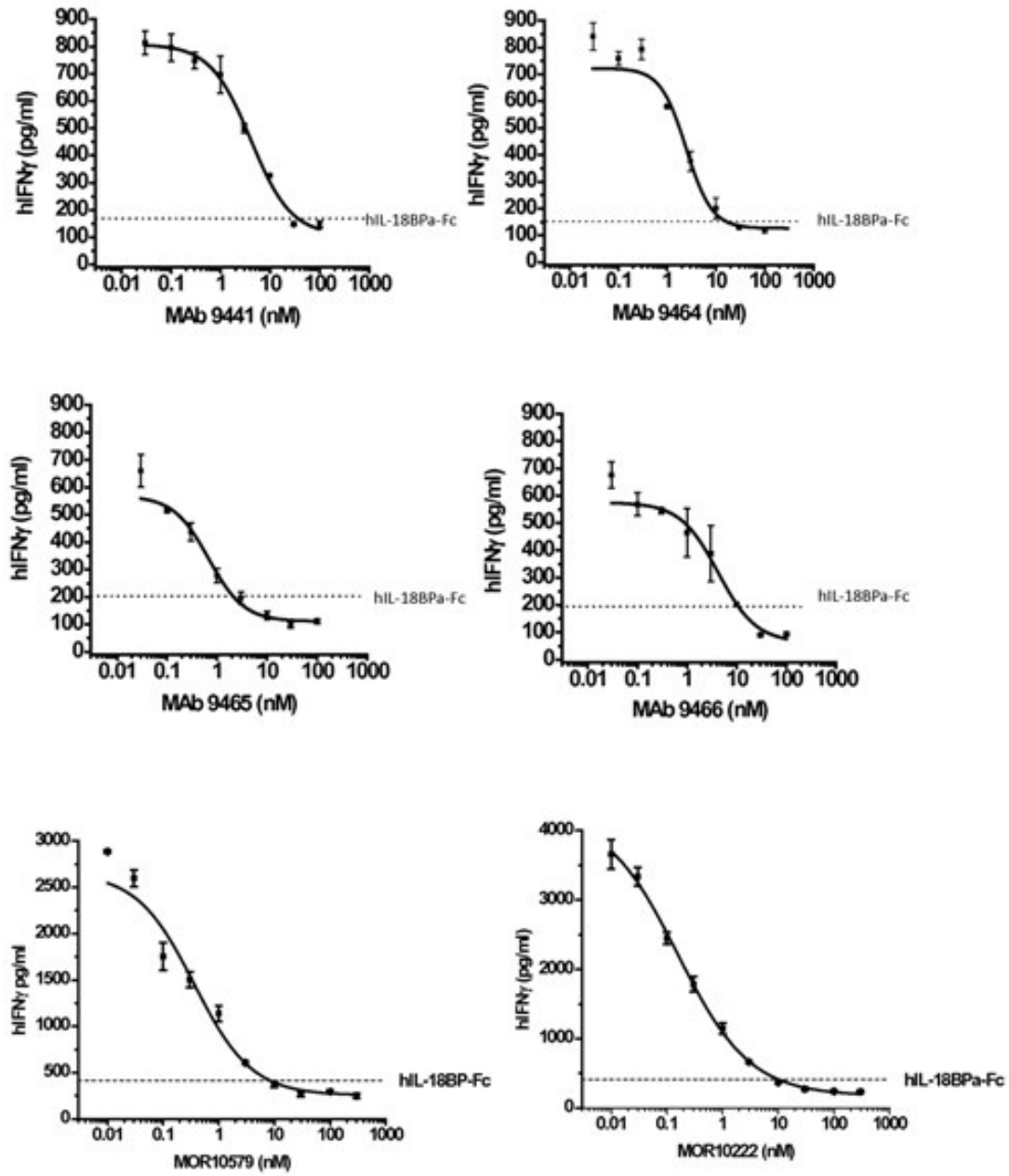


Figura 3(B)

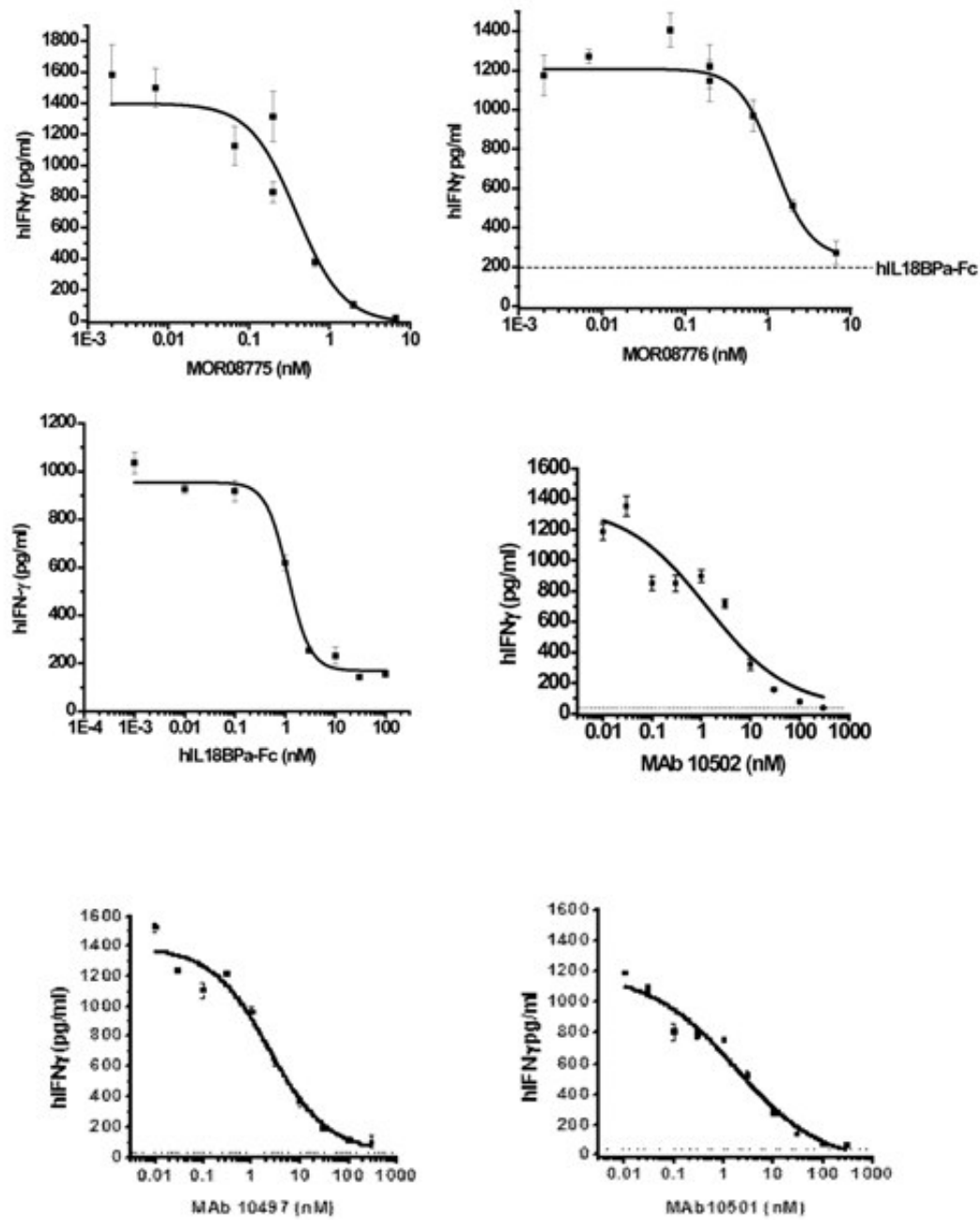


Figura 3(C)

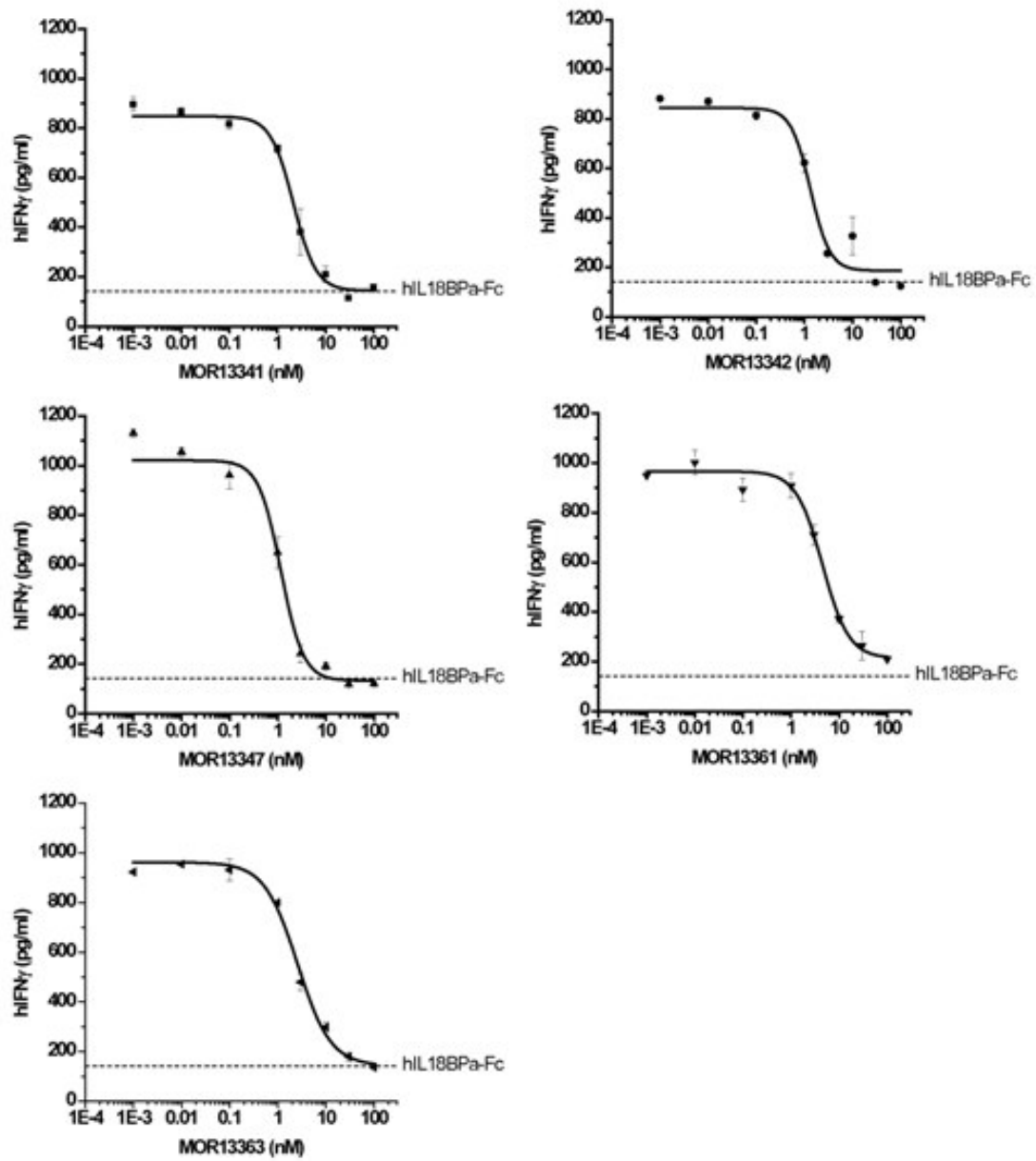


Figura 3(D)

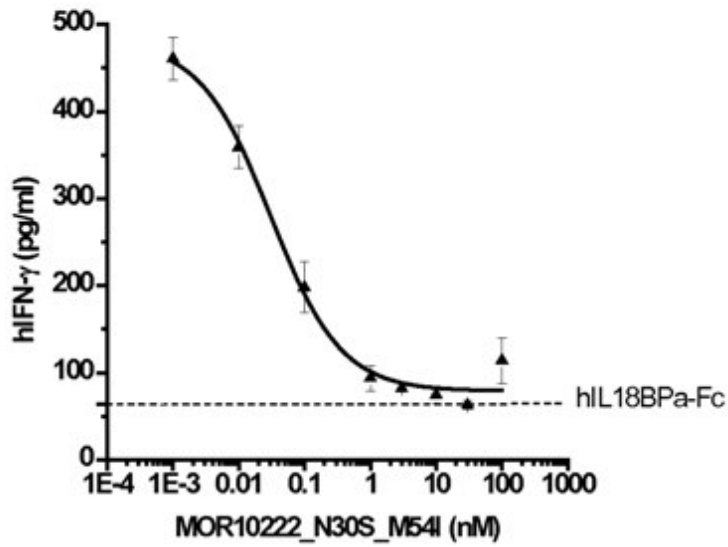
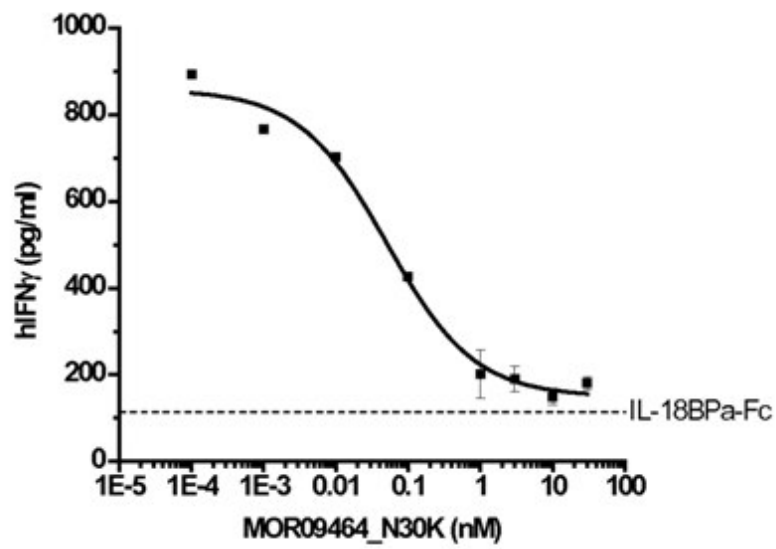


Figura 4(A)

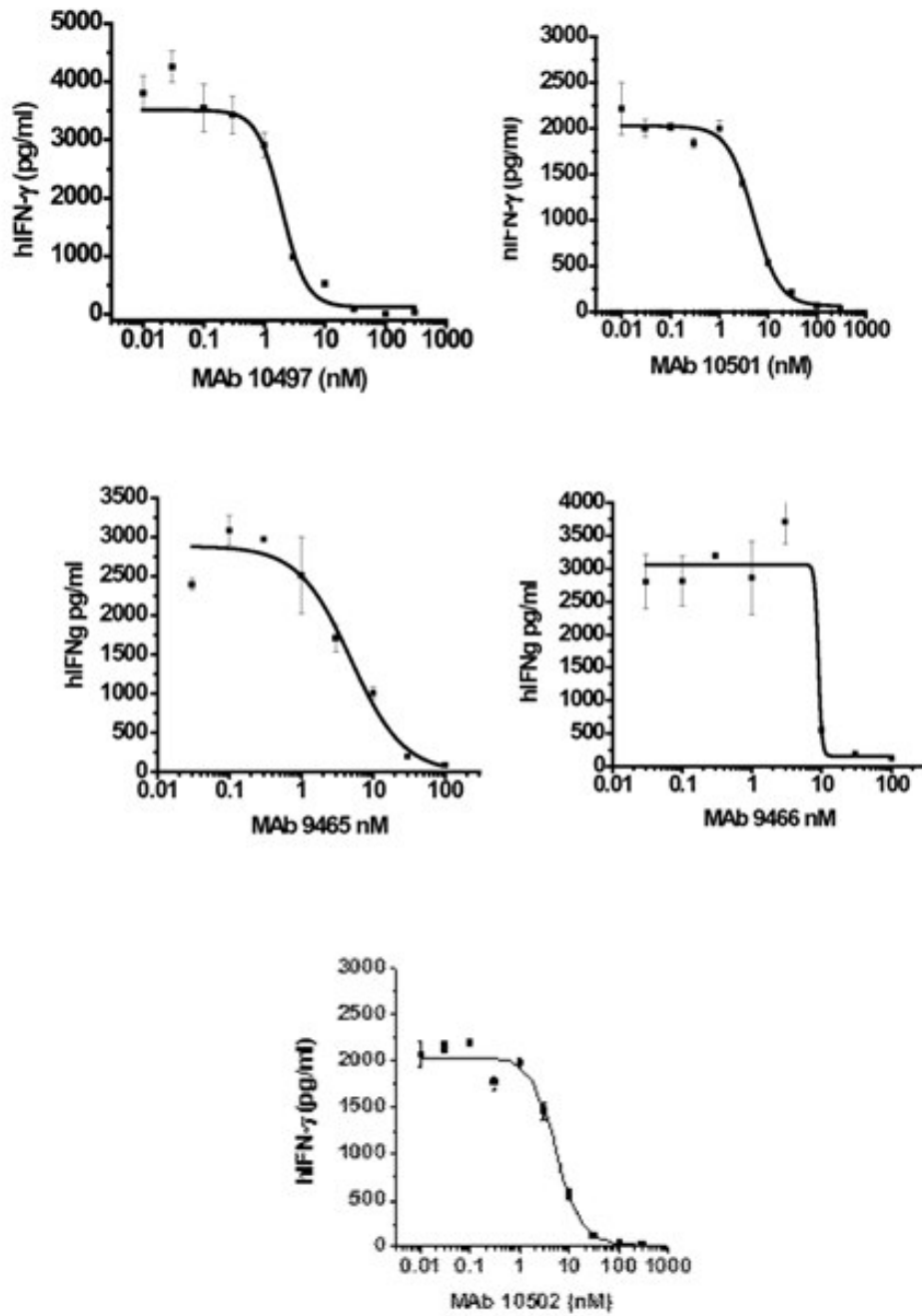


Figura 4(B)

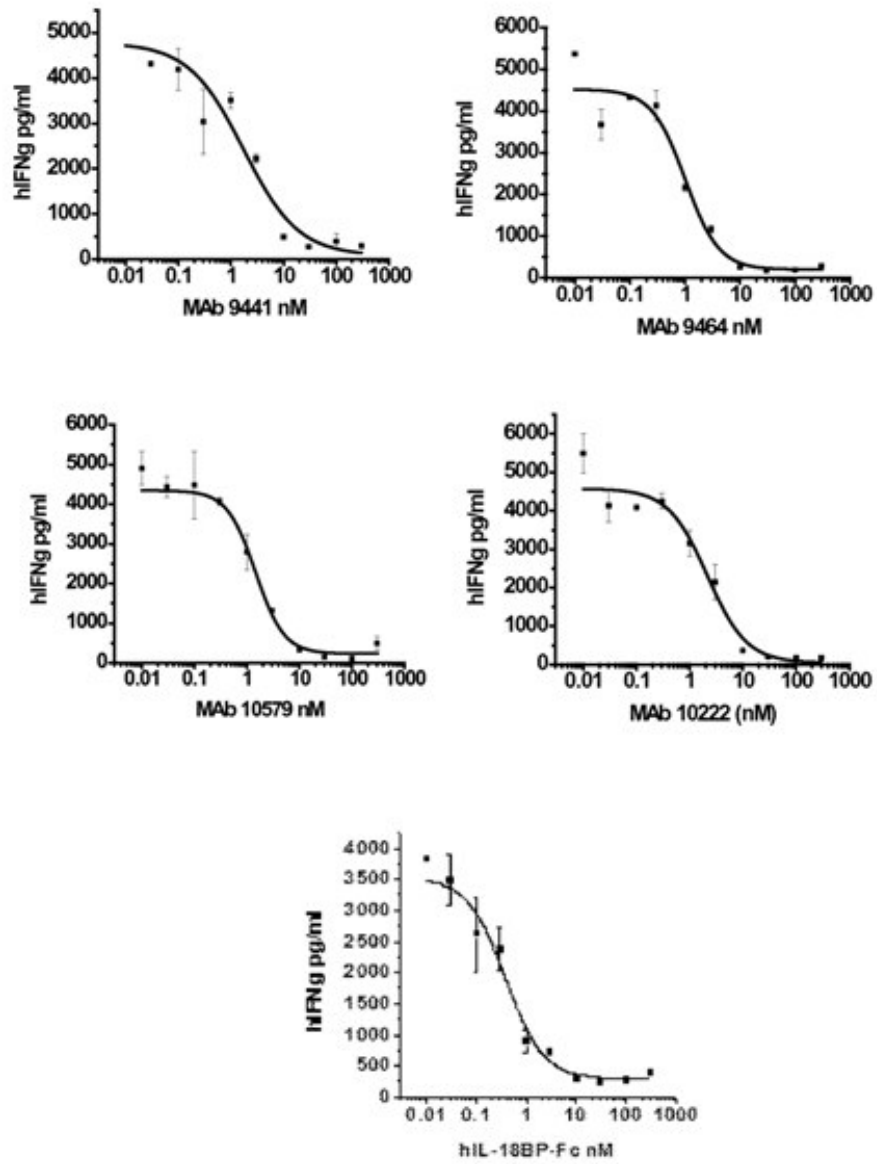


Figura 5(A)

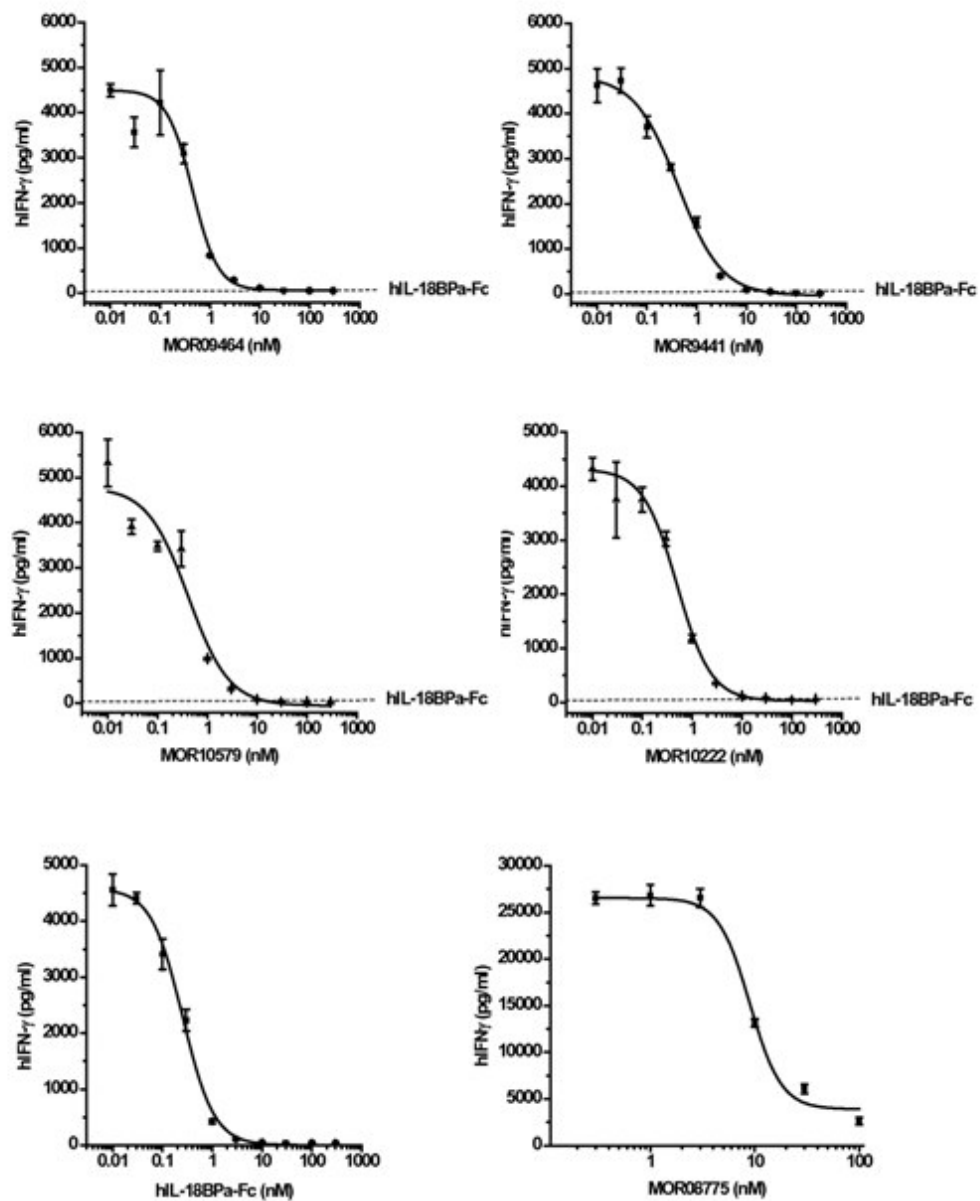


Figura 5(B)

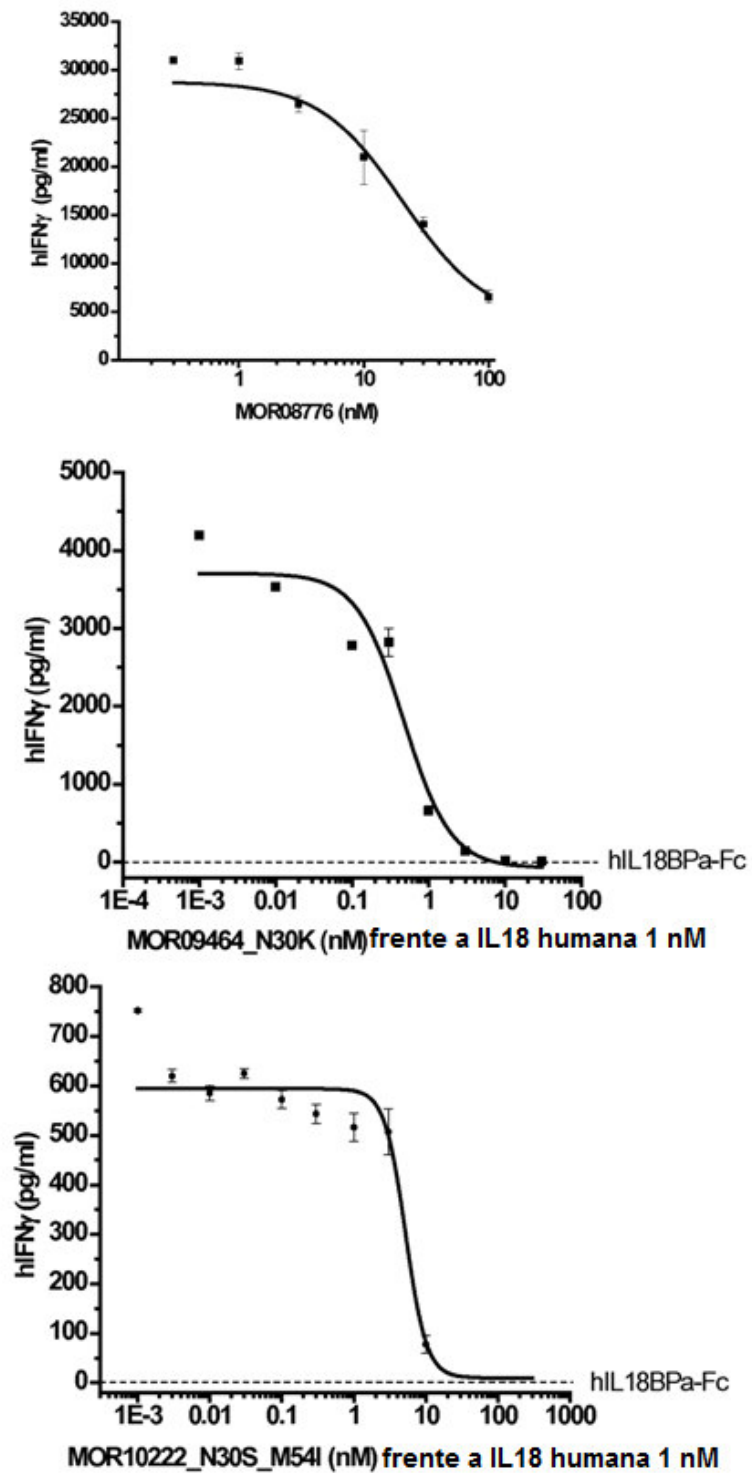


Figura 5(C)

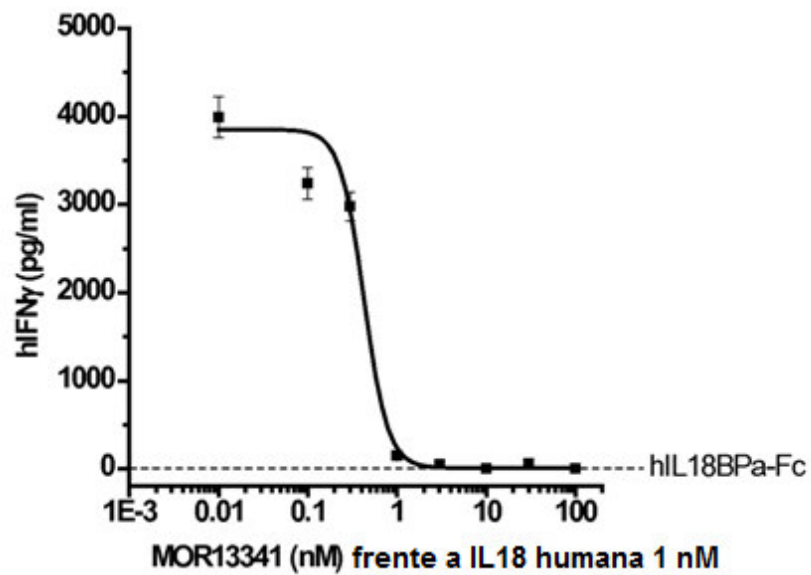
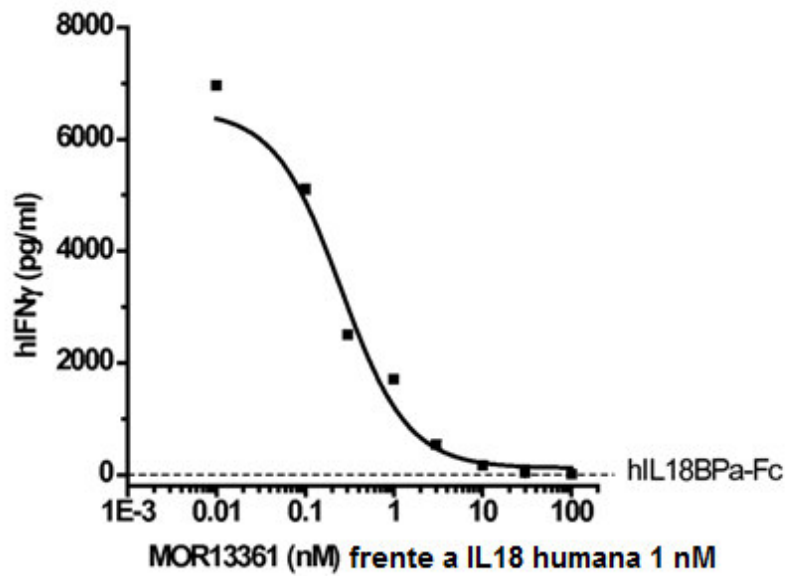


Figura 6(A)

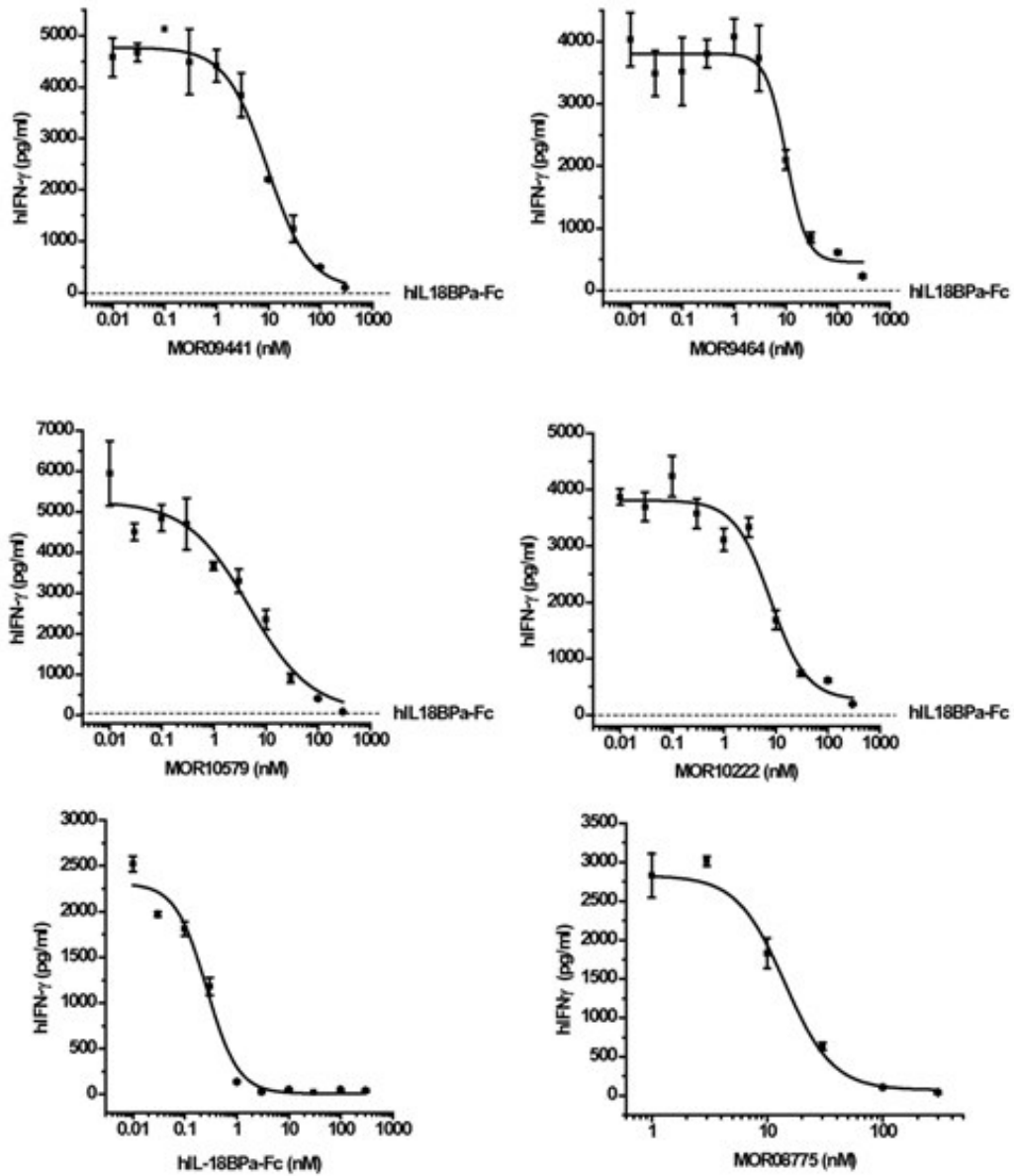


Figura 6(B)

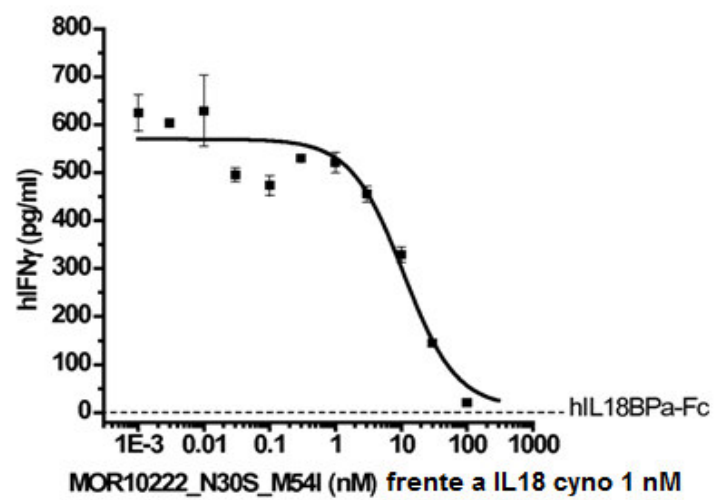
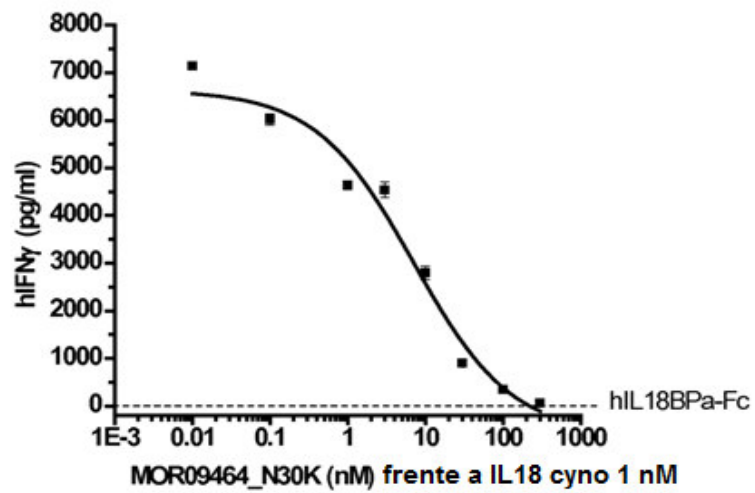
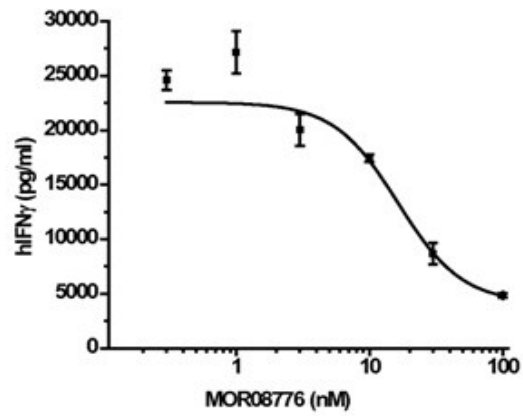


Figura 6 C

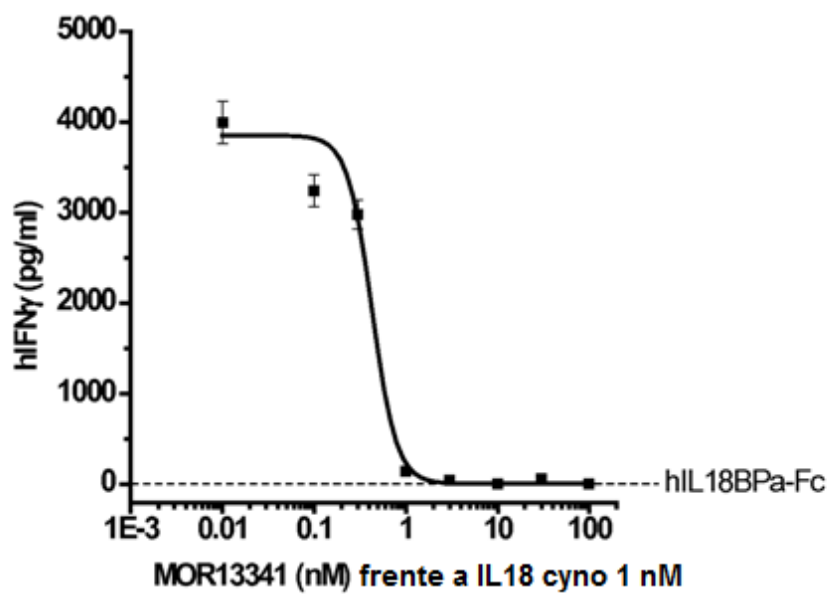
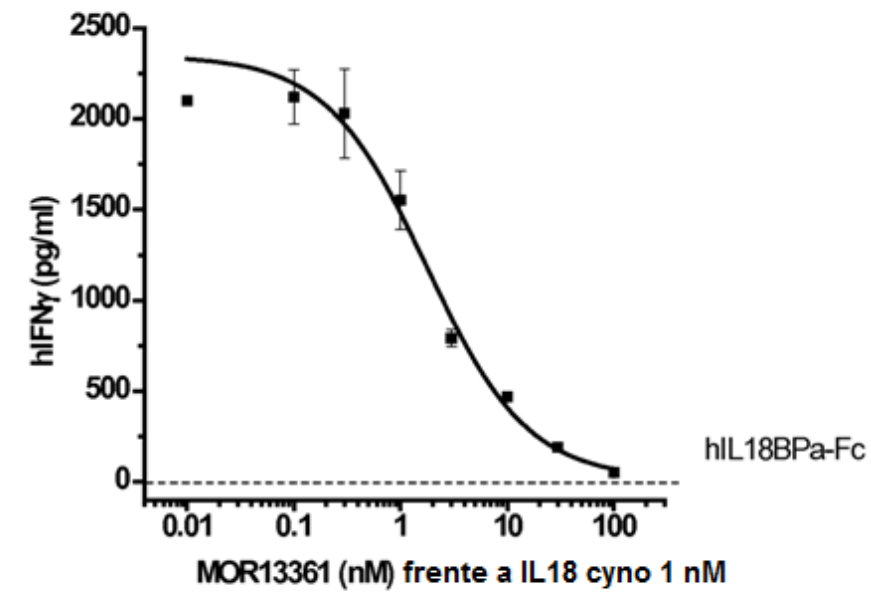


Figura 7(A)

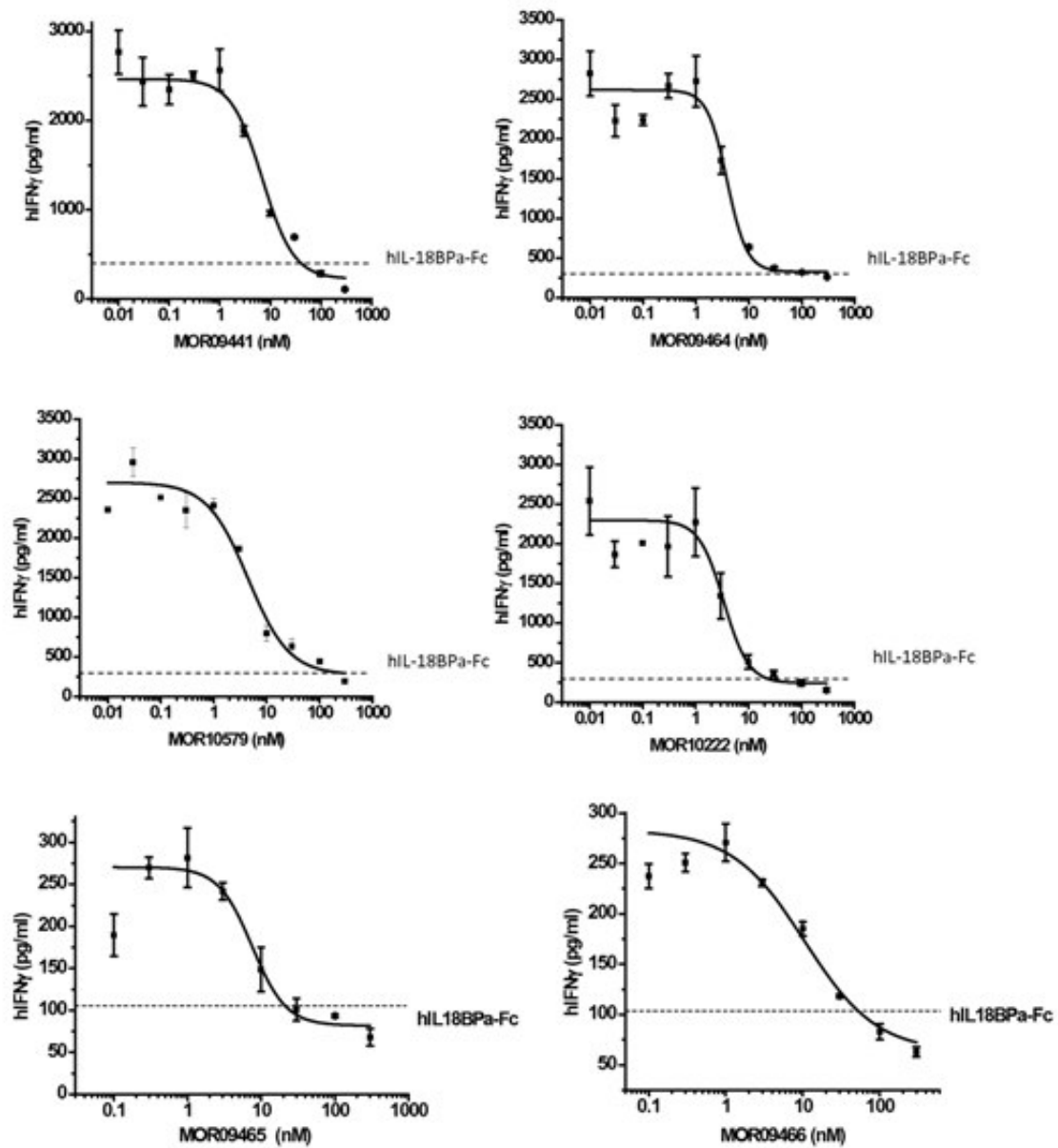


Figura 7(B)

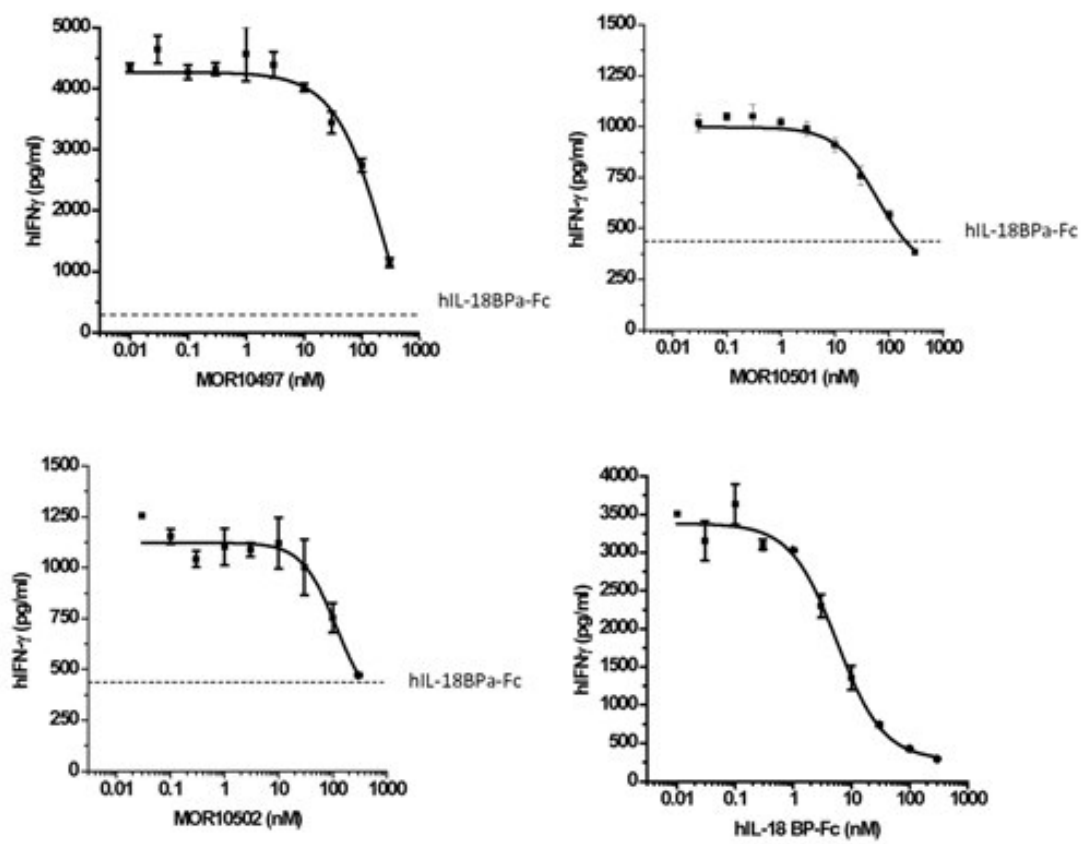


Figura 7(C)

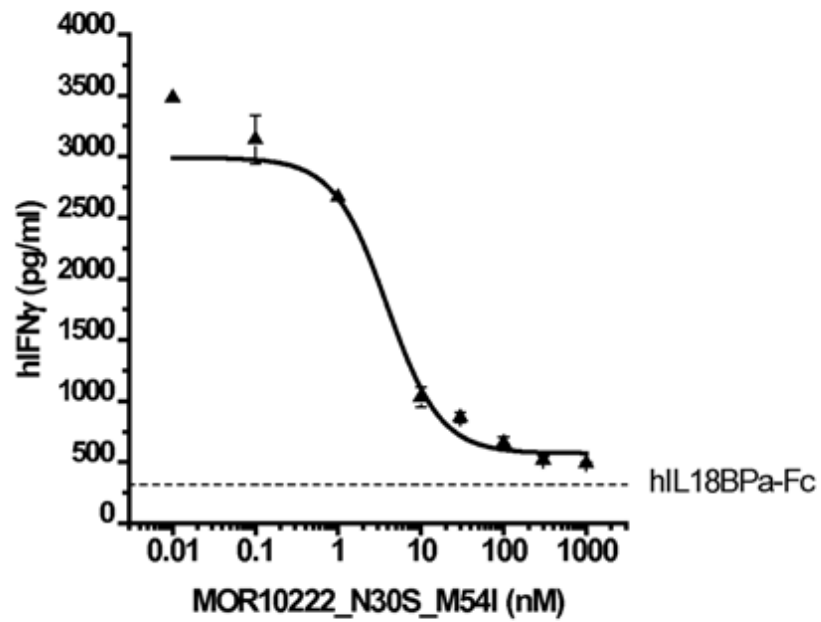
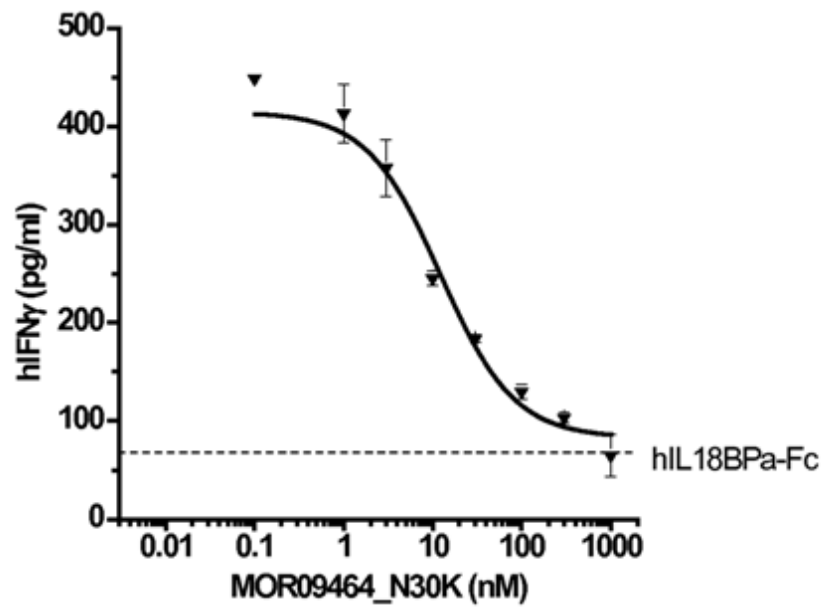


Figura 7(D)

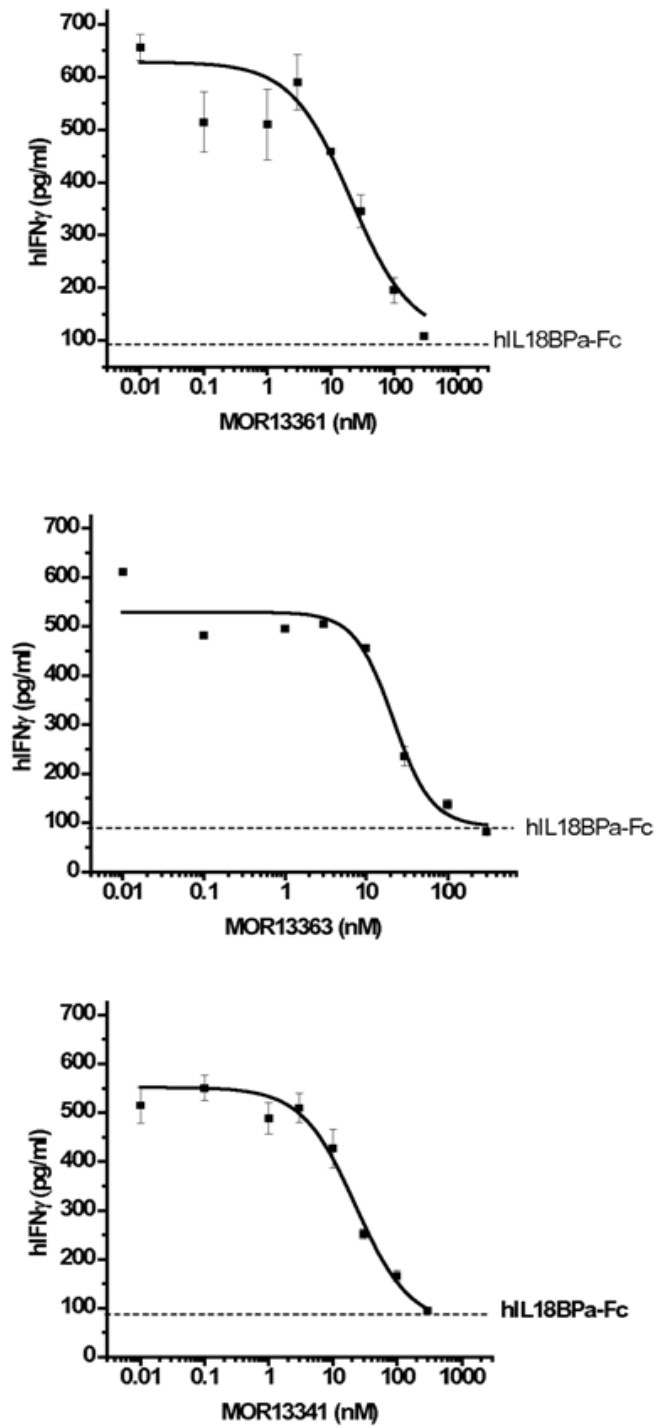


Figura 7(E)

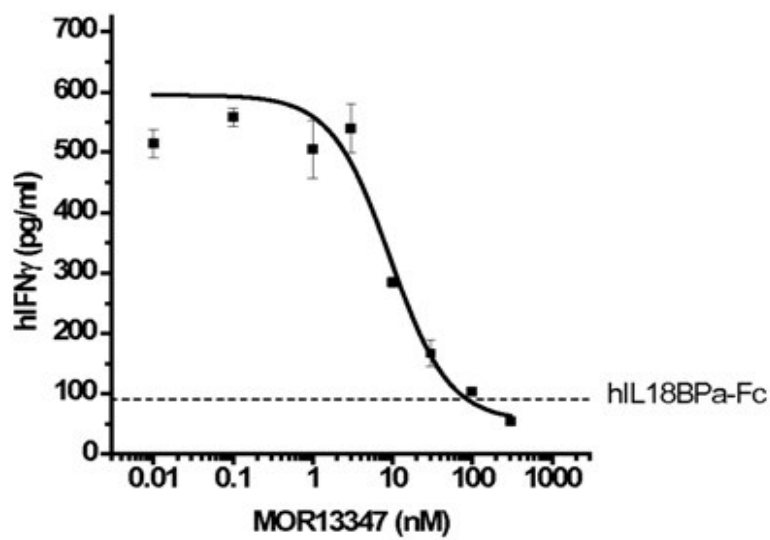
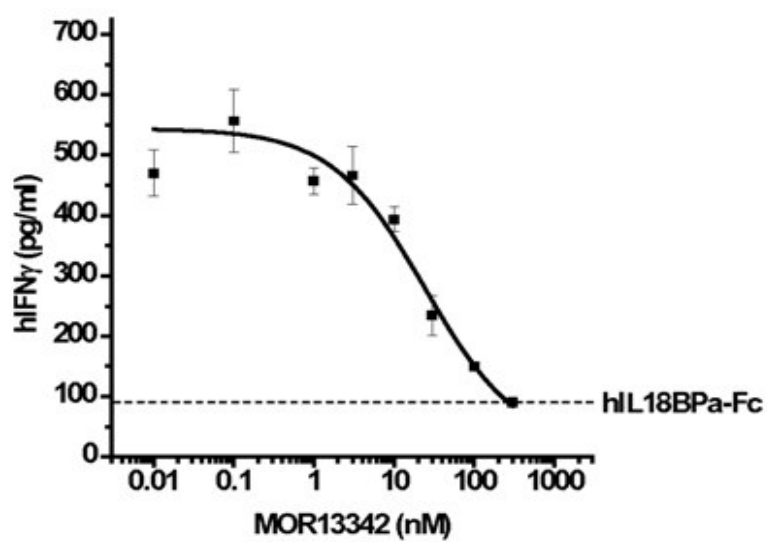


Figura 8A

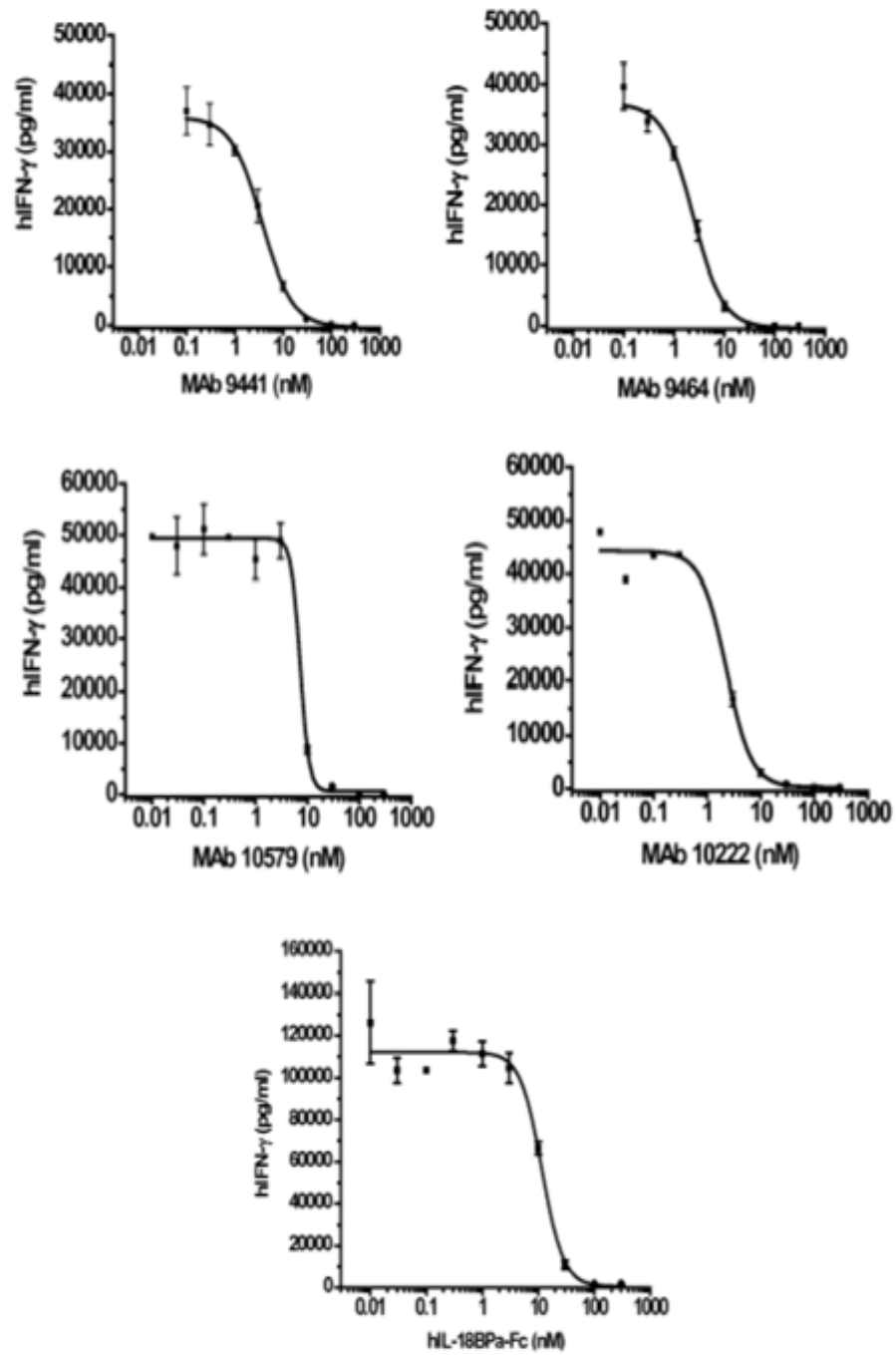


Figura 8B

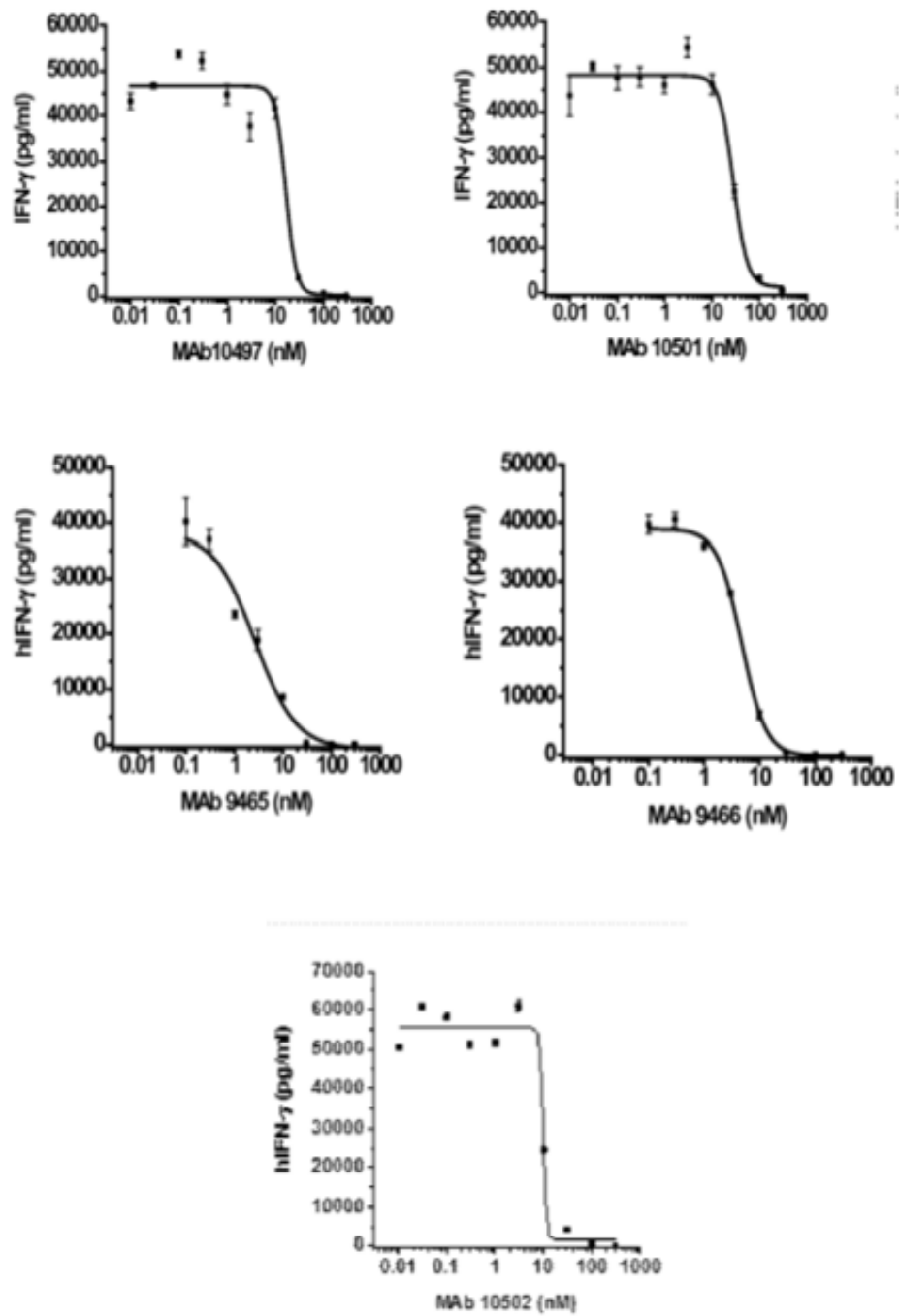


Figura 8(C)

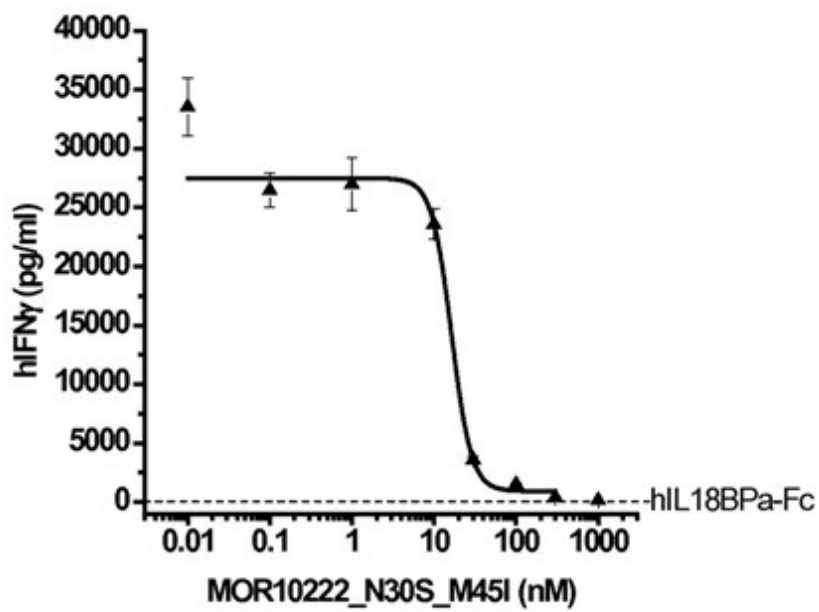
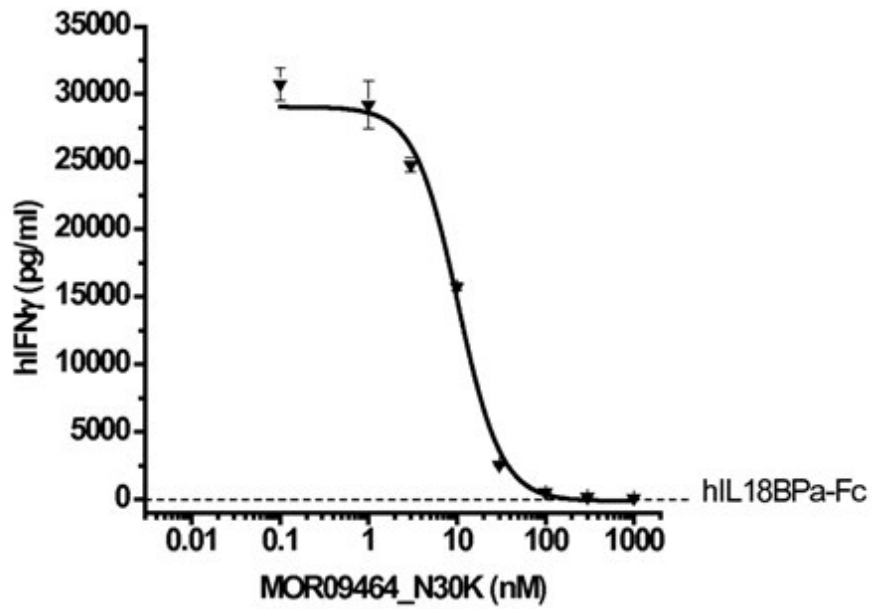


Figura 8(D)

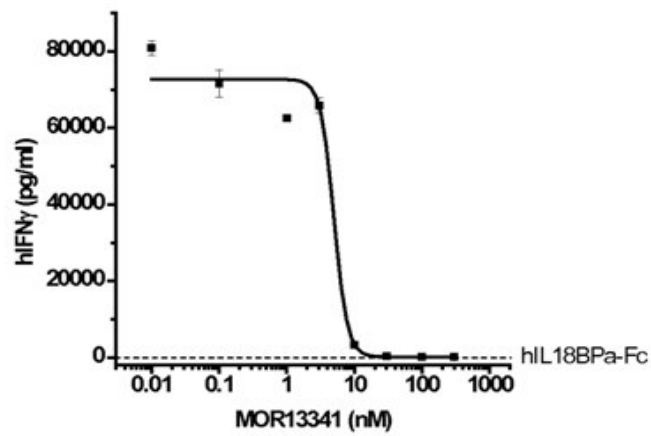
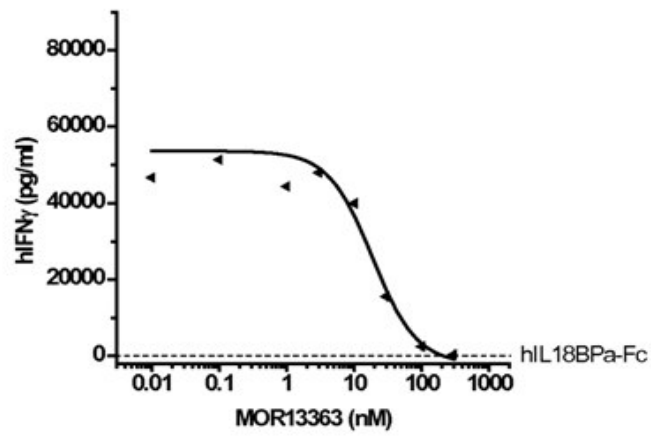
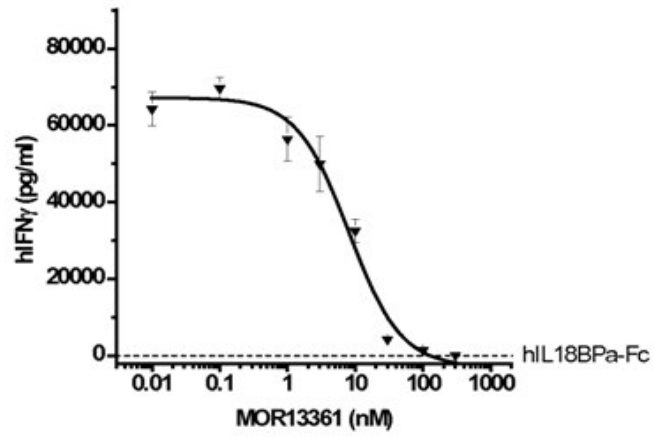


Figura 8(E)

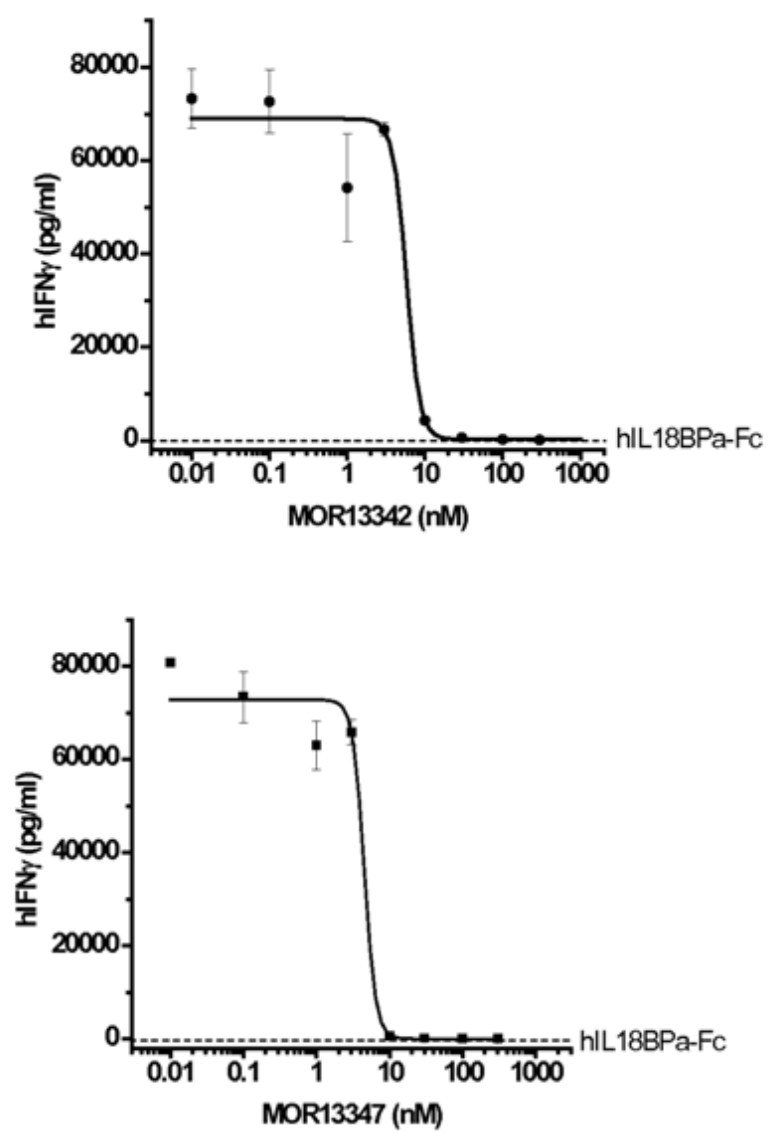


Figura 9(A)

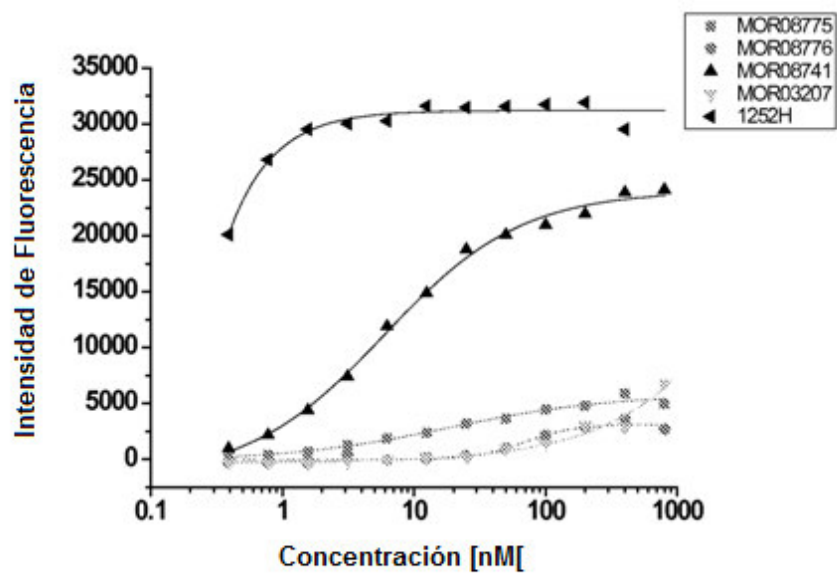


Figura 9(B)

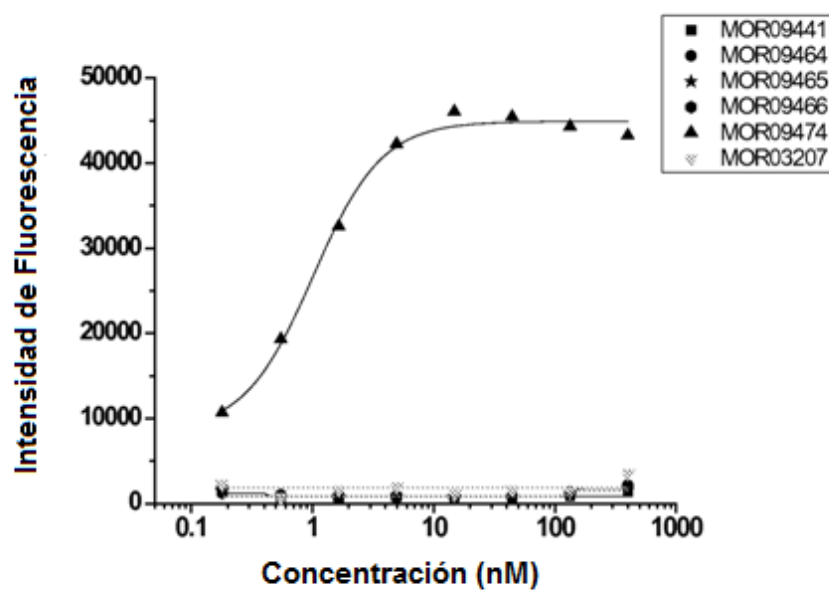


Figura 10(A)

	ABT325	125-2H	IL18-BP	MOR08776	MOR08775
ABT325					
125-2H					
IL18-BP					
MOR08776					
MOR08775					
MOR09066					

Figura 10(B)

	ABT325	125-2H	IL18-BP	MOR9464_N30K	MOR10222_N30S_M54I	MOR13341	MOR9464
ABT325							
125-2H							
IL18-BP							
MOR9464_N30K							
MOR10222_N30S_M54I							
MOR13341							
MOR9464							

Figura 11(A)

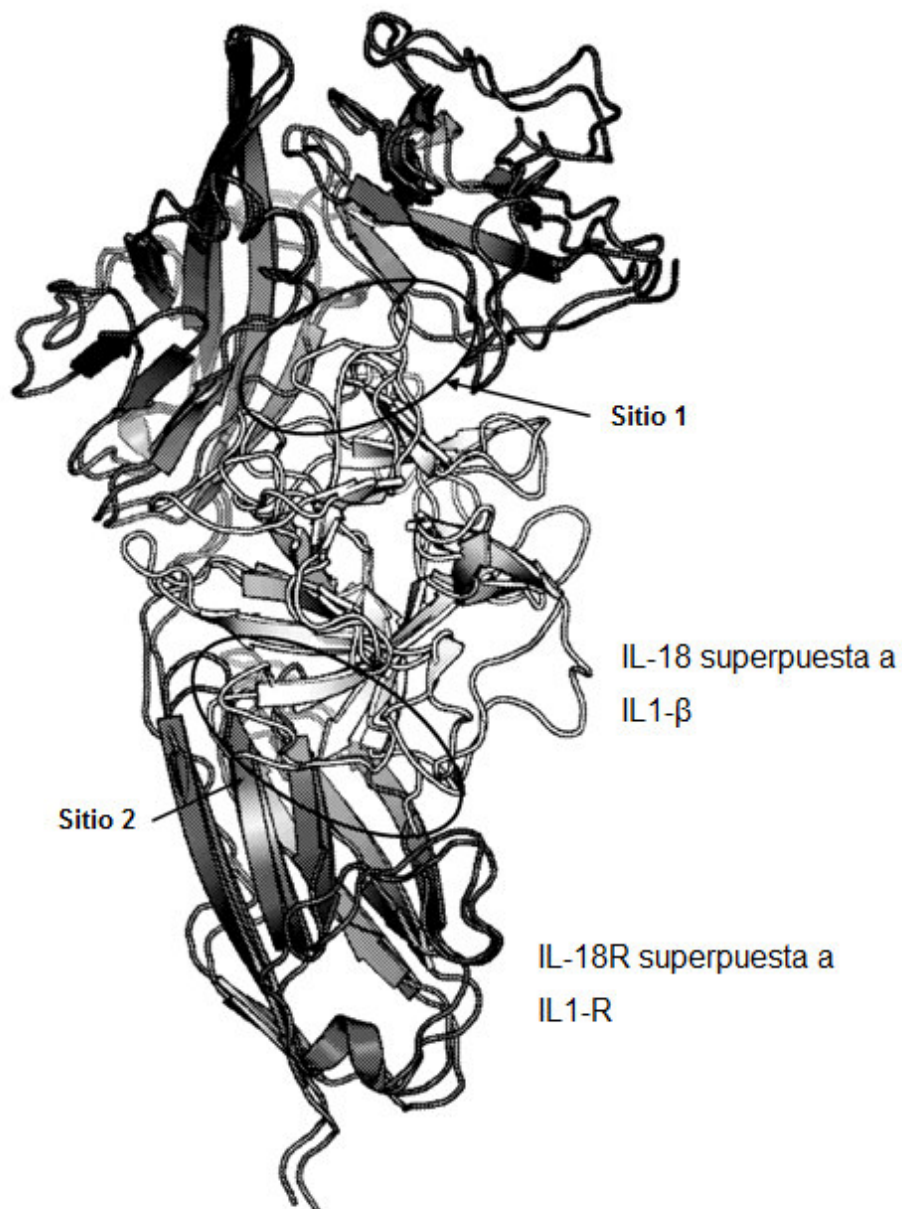
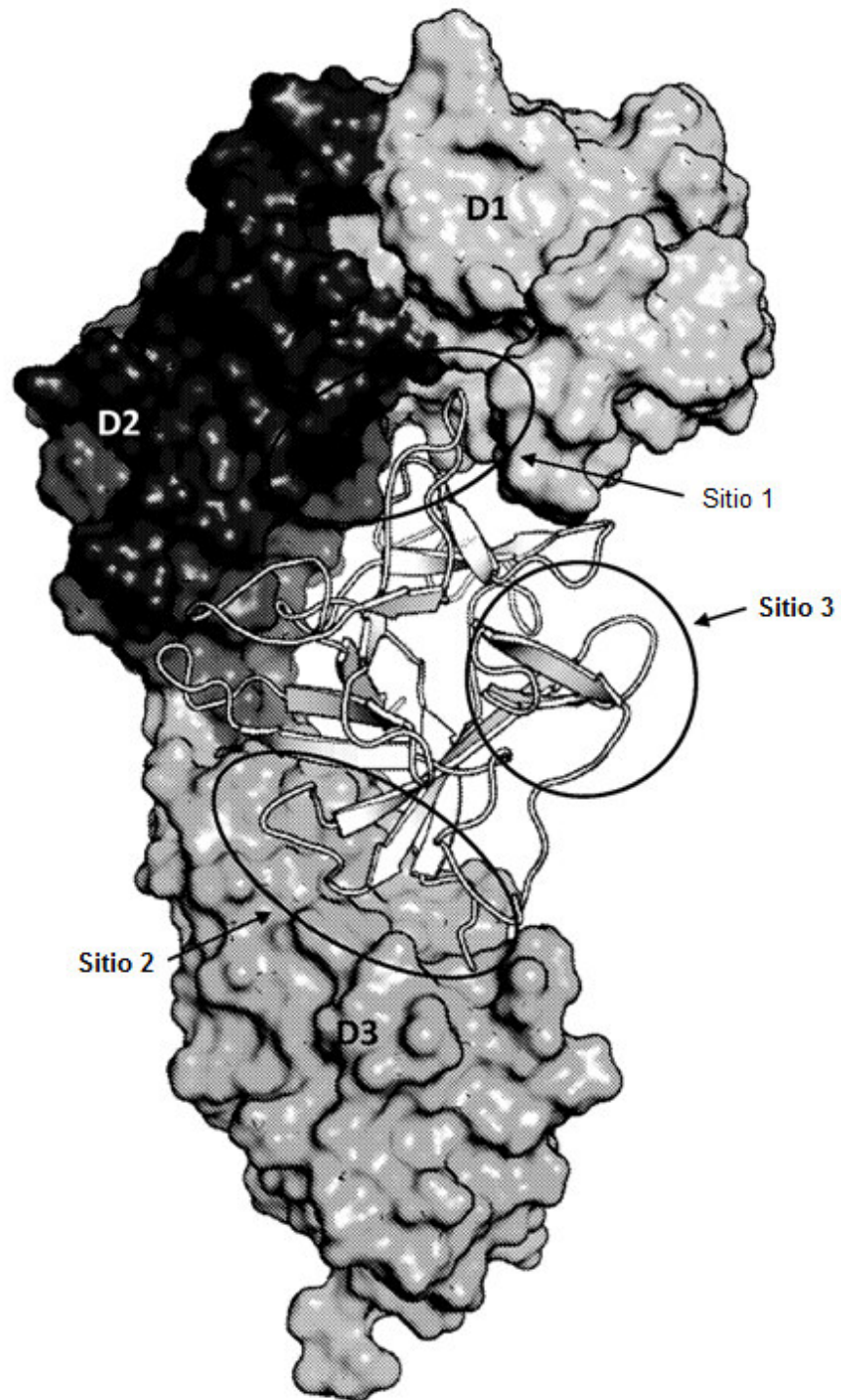


Figura 11(B)



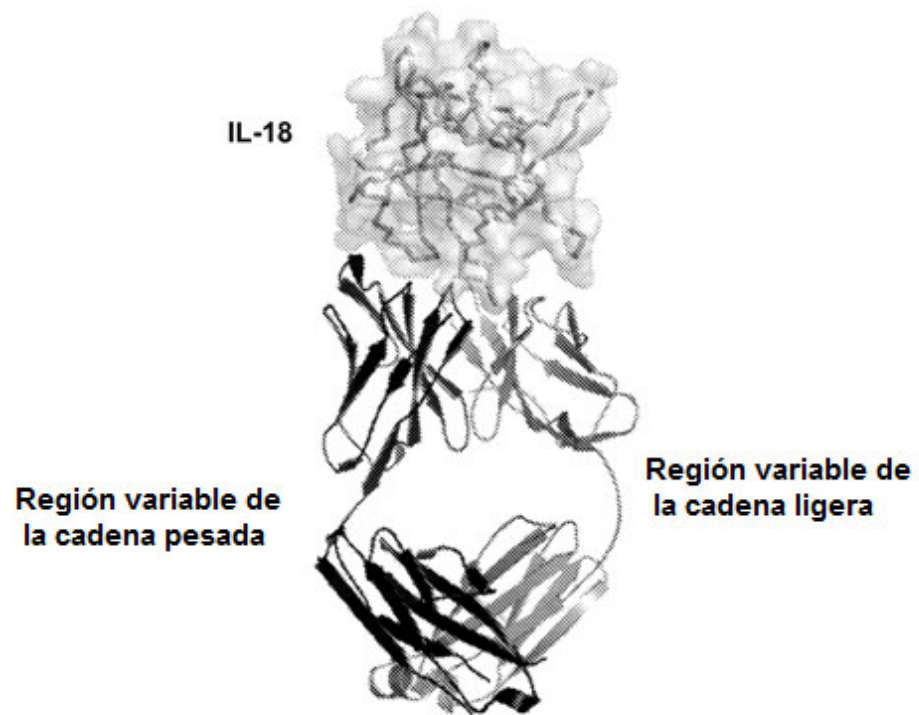
1) IL-18 Humana	YFGK ¹⁰ LESKLSVIRN ³⁰ INDQVLFDIQ ⁶⁰ GNRPLFEDMT ⁷⁰ DSDCRDNAPR ⁸⁰ TIFIISM ⁹⁰ MYKD ⁹⁰ SQPRGMAVTI ¹⁰⁰ SVKCENKI
2) Kim et all	E I M K M
3) Krumm et all	YFG L K I MYKD ⁹⁰ S PRGMAV
4) IL-18α	K ⁴⁰ L K R D M D R M
5) H/DxMS	MYKD ⁹⁰ SQPRGMAVT

1) IL-18 Humana	STL ¹¹⁰ SCENKIISFK ¹²⁰ EMNPPDNIKD ¹³⁰ TKSDIIFFQR ¹⁴⁰ SVPGHDKMKQ ¹⁵⁰ FESSSYEGYF ¹⁶⁰ LACEKERDLF ¹⁷⁰ KLILK
2) Kim et all	N Q ^{R140} S DNKM
3) Krumm et all	N Q ^{R140} S DN M
4) IL-18Rα	R
5) H/DxMS	FK ¹²⁰ EMNPPDNIKD ¹³⁰ TKSDIIFFQR ¹⁴⁰ SVPGHDKMKQ ¹⁵⁰ FESSSYEGYF

1) IL-18 Humana	KEDEL ¹⁸⁰ GDRSIMFTTVQ ¹⁹⁰ NED
2) Kim et all	V N
3) Krumm et all	V
4) IL-18Rα	
5) H/DxMS	

Figura 12

Figura 13



	47	86	99	115		
IL-18 Humana	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFI	DOGNRP	LFEDMTDSDCD	RNPRTIFII	MYKDSQPRGM	AVTISVKCENKISTLSCE
IL-18 Cyno.	YFGKLESKLSIIRNLNDQVLFI	DOGNRP	LFEDMTDSDCD	RNPRTIFII	MYKDSQPRGM	AVTISVKCENRISTLSCE

	170	177				
IL-18 Humana	NKIIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQ	SVPGHDNKM	QFESSSYEGYFLACEKERDII	FKLILKKDEDELGDRS	IMFTVQ	NED
IL-18 Cyno.	NKIIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQ	SVPGHDNKM	QFESSSYEGYFLACEKERDII	FKLILKKDEDELGDRS	IMFTVQ	NED

Figura 14(A)

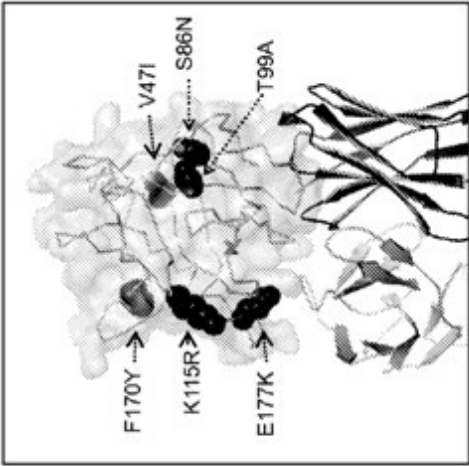
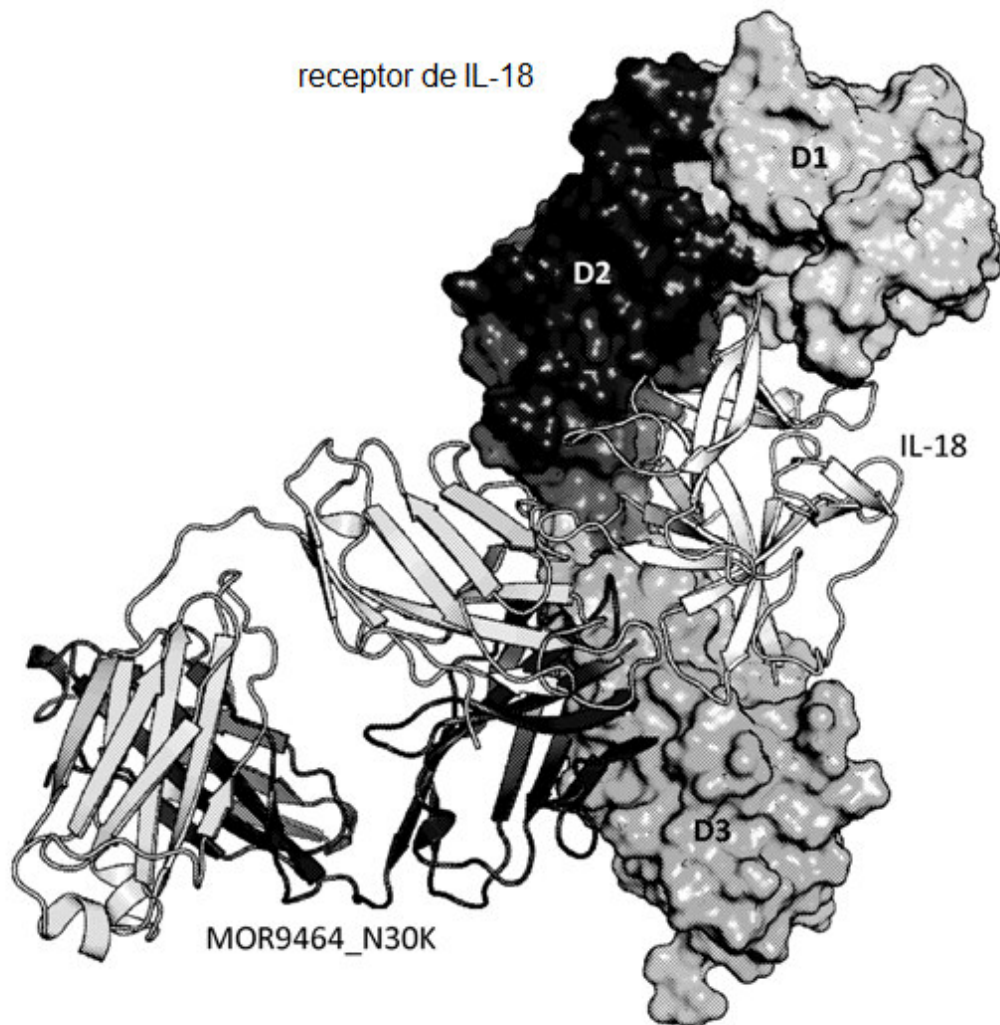


Figura 14(B)

Figura 15



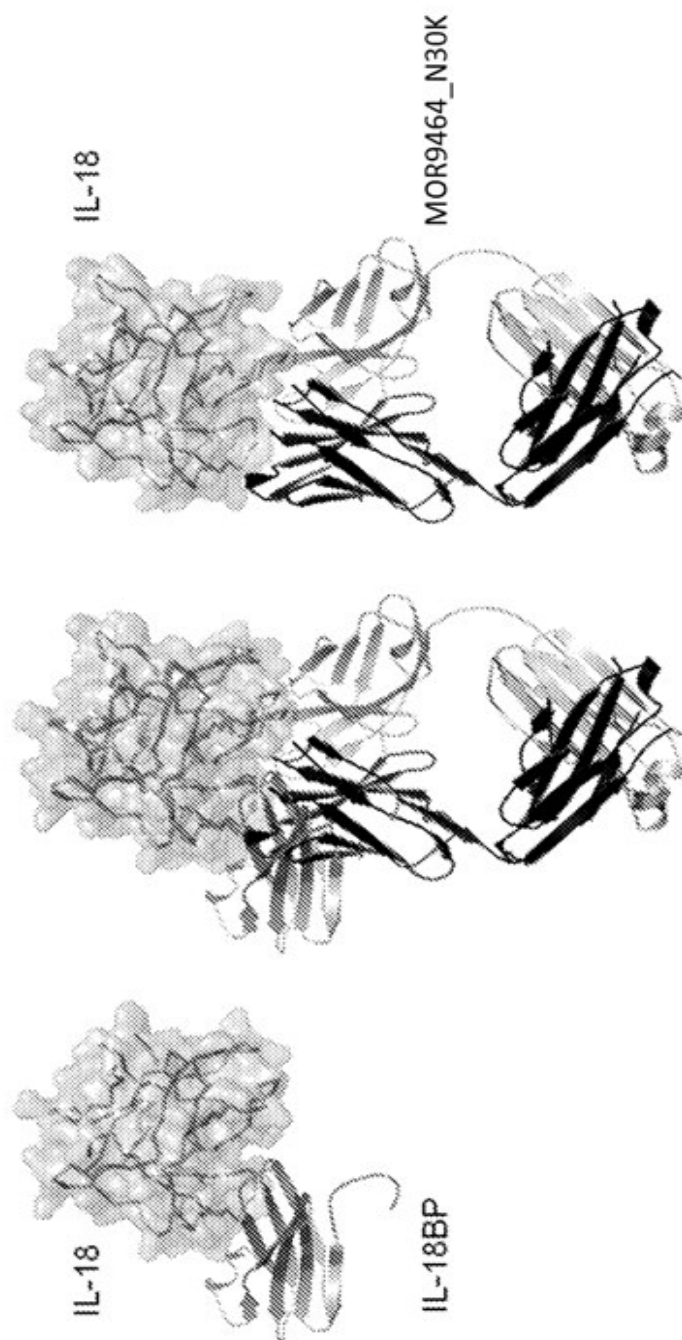


Figura 16

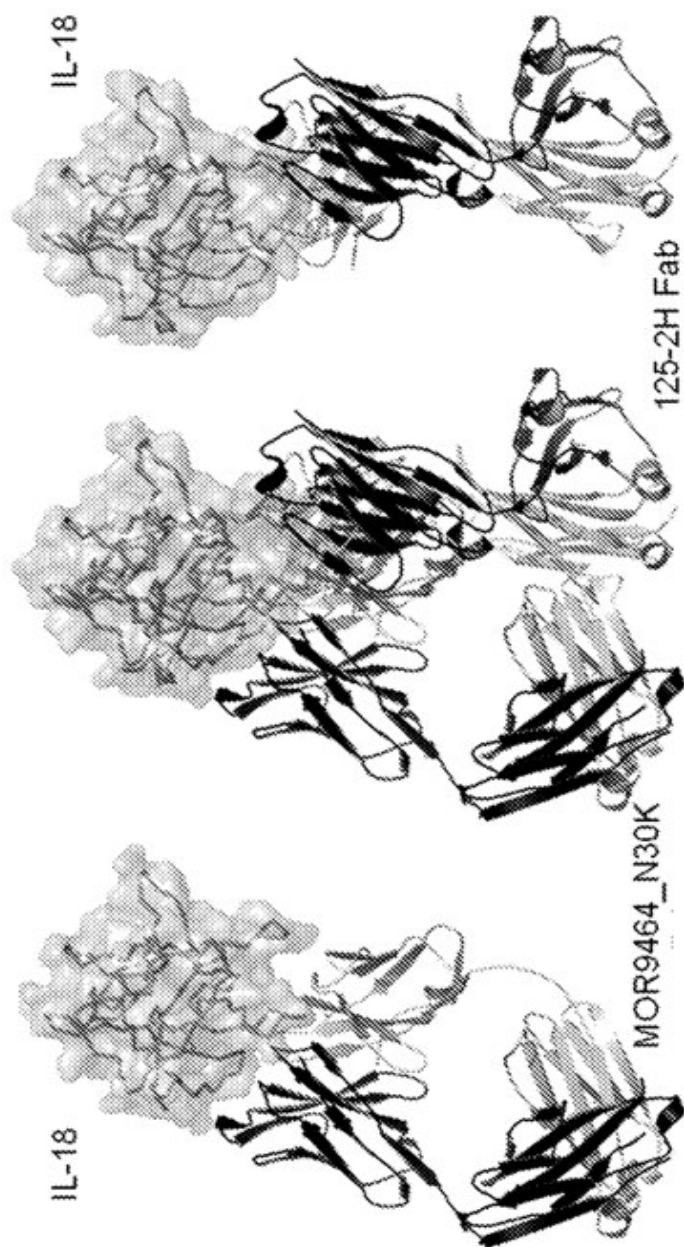


Figura 17



Figura 18

Figura 19

