



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 335 232**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 5/12 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06773749 .4**

(96) Fecha de presentación : **21.06.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1899378**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **19.03.2008**

(54)

Título: **Anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen a la IL-1 β .**

(30)

Prioridad: **21.06.2005 US 692830 P**

(45)

Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.03.2010

(45)

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.03.2010

(73)

Titular/es: **XOMA Technology Ltd.**
c/o XOMA (US) LLC, 2910 Seventh Street
Berkeley, California 94710, US

(72)

Inventor/es: **Masat, Linda;**
Haak-Frendscho, Mary;
Cheng, Gang;
Horwitz, Arnold y
Roell, Marina

(74)

Agente: **Mir Plaja, Mireia**

ES 2 335 232 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

Anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen a la IL-1 β .

5 **Ámbito de la invención**

La invención se refiere a los anticuerpos que se unen a la IL-1 β , incluyendo a fragmentos de los mismos, y a los ácidos nucleicos que codifican tales anticuerpos, así como a vectores, células y composiciones que comprenden los anticuerpos o ácidos nucleicos, y a los usos de los mismos.

10 **Antecedentes de la invención**

La familia de las citoquinas de las interleuquinas-1 (IL-1) ha venido estando implicada en estados de enfermedad tales como la artritis reumatoidea (RA), la osteoartritis, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa (UC), el shock séptico, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), el asma, la enfermedad de injerto versus huésped, la aterosclerosis, la leucemia de células T del adulto, el mieloma múltiple, la esclerosis múltiple, la crisis fulminante y la enfermedad de Alzheimer. Los miembros de la familia de las IL-1 incluyen a la IL-1 α , la IL-1 β y la IL-1Ra. A pesar de que están emparentadas por su capacidad para fijarse a los receptores de IL-1 (IL-1RA1 e IL-1R2), cada una de estas citoquinas es expresada por un gen distinto y tiene una distinta secuencia de aminoácidos primarios. Además pueden distinguirse unas de otras las actividades fisiológicas de estas citoquinas.

Se han investigado compuestos que trastornan la señalización de los receptores de IL-1 como agentes terapéuticos para tratar las enfermedades mediadas por IL-1. Estos compuestos incluyen a la IL-1Ra recombinante (Amgen Inc., Thousand Oaks, CA) y el péptido “trampa” de receptores de IL-1 (Regeneron Inc., Tarrytown, NY). También han sido investigados anticuerpos monoclonales derivados de animales que se unen a las citoquinas IL-1. Sin embargo, su valor clínico puede ser limitado debido a su inmunogenicidad. Por ejemplo, ha llegado a ser sabido que sujetos humanos a los que se les administran anticuerpos monoclonales de ratón producen anticuerpos anti-ratón humanos (HAMA). Se ha descrito que los HAMA reducen la eficacia de la terapia con anticuerpos monoclonales y producen reacciones adversas entre las que se incluyen las lesiones renales. Otros anticuerpos para IL-1 β pueden quedar limitados por su afinidad de fijación y/o su potencia. En consecuencia, se necesitan compuestos adicionales que trastornen la señalización de los receptores de IL-1. La invención aporta tales compuestos, así como métodos para preparar y usar tales compuestos.

30 **Breve resumen**

La invención aporta un anticuerpo que se une a la IL-1 β o un fragmento del mismo que se une a la IL-1 β y comprende una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 11 y una región de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 15. También se aporta aquí un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento del anticuerpo, así como un vector que comprende el ácido nucleico, una célula que comprende el ácido nucleico o el vector, y una composición que comprende el anticuerpo, el ácido nucleico o el vector.

En el contexto se describe un método que es para tratar o prevenir una enfermedad en un mamífero y comprende el paso de administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención a un mamífero que tenga necesidad de ello, con lo cual se trata o previene una enfermedad en el mamífero.

En el contexto de la presente invención se describe un método de preparación de un polipéptido madurado por afinidad que se une a la IL-1 β , comprendiendo dicho método los pasos de: (a) prever un primer ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que se une a la IL-1 β y comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los ID SEC NÚMS.: 1-26 y un segundo ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que se diferencia de la primera secuencia de ácido nucleico en al menos un nucleótido, (b) llevar a cabo una mezcla de ácidos nucleicos para así contar con dos o más ácidos nucleicos mutados, (c) seleccionar un ácido nucleico que codifique un polipéptido que (I) se una a la IL-1 β con una afinidad mayor que la del polipéptido codificado por el primer ácido nucleico, (II) tenga una selectividad para la IL-1 β con preferencia sobre la IL-1 α que sea mayor que la del polipéptido codificado por el primer ácido nucleico, (III) tenga una constante de disociación de la unión en equilibrio (K_D) para IL-1 β que sea más baja que la del polipéptido codificado por el primer ácido nucleico, o (IV) inhiba la expresión inducida por IL-1 β de IL-6 sérica en un animal en mayor grado que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico, y (d) expresar el ácido nucleico mutado seleccionado, con lo cual se produce un polipéptido madurado por afinidad que se une a la IL-1 β .

La invención aporta nuevos anticuerpos que se unen a la IL-1 β o fragmentos de los mismos que se unen a la IL-1 β , los cuales se unen a la IL-1 β humana con una constante de disociación de menos de 3 pM, como alternativa de aproximadamente 2 pM o menos, y preferiblemente de poco más o menos 1 pM o menos. Tales anticuerpos de alta afinidad se contemplan como útiles para varios métodos para tratar o prevenir enfermedades o estados relacionados con la IL-1. Adicionalmente, los anticuerpos que se unen a la IL-1 β o los fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden unirse a un epítipo de IL-1 β de forma tal que el anticuerpo o fragmento unido no impida considerablemente que la IL-1 β se fije al receptor tipo I de IL-1. Adicionalmente, los anticuerpos que se unen a la IL-1 β o los fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden unirse a en sustancia el mismo epítipo como uno o varios de los anticuerpos indicados como

ejemplos que aquí se describen, tales como el anticuerpo denominado AB7, que comprende una región variable de cadena pesada. Adicionalmente, los anticuerpos que se unen a la IL-1 β o los fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden competir con la unión de un anticuerpo que tenga la región variable de cadena liviana de la ID SEC N°: 11 y la región variable de cadena pesada de la ID SEC N°: 15. Adicionalmente, la presente invención incluye a los anticuerpos que se unen a la IL-1 β o los fragmentos que se unen a la IL-1 β y pueden unirse a un epítipo contenido en la secuencia ESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIE (ID SEC N°: 36). Los ejemplos de anticuerpos que se unen a la IL-1 β incluyen al anticuerpo que aquí se ha denominado AB7.

La invención también aporta anticuerpos que se unen a la IL-1 o fragmentos de los mismos que se unen a la IL-1 β y tienen una constante de disociación de menos de 3 pM, y como alternativa de aproximadamente 1 pM o menos, y comprenden una región variable de cadena pesada que comprende una de las secuencias de aminoácidos de la ID SEC N°: 15. El anticuerpo que se une a la IL-1 β o el fragmento que se une a la IL-1 β puede también comprender una región variable de cadena liviana que comprenda la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 11.

En el contexto de la presente invención se describen anticuerpos que se unen a la IL-1 β o fragmentos de los mismos que se unen a la IL-1 β , los cuales se unen a la IL-1 β con una constante de disociación de entre aproximadamente 6 pM y aproximadamente 50 pM, como alternativa de entre aproximadamente 13 pM y aproximadamente 25 pM, y como alternativa de aproximadamente 19 pM, donde el anticuerpo o fragmento tiene una IC₅₀ de menos de 0,5 nM (500 pM), como alternativa de entre aproximadamente 5 pM y aproximadamente 200 pM, como alternativa de entre aproximadamente 10 pM y aproximadamente 100 pM, y como alternativa de aproximadamente 30 pM, para inhibir la liberación estimulada por IL-1 β de IL-6 desde fibroblastos humanos. La expresión IC₅₀ para inhibir la liberación estimulada por IL-1 β de IL-6 desde fibroblastos humanos se refiere a la concentración requerida para inhibir el 50% de la liberación de IL-6 por estimulación de los fibroblastos humanos con IL-1 β . Los ejemplos de anticuerpos incluyen al anticuerpo al que aquí se denomina AB1.

En el contexto de la presente invención se describen anticuerpos que se unen a la IL-1 o fragmentos de los mismos que se unen a la IL-1 β y tienen una constante de disociación de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 50 pM y comprenden una región variable de cadena pesada que comprende una de las secuencias de aminoácidos de las ID SEC NÚMS. 2 4, 5 o 6, como alternativa una de las secuencias de aminoácidos de las ID SEC NÚMS.: 4 o 5, y como alternativa las secuencias de aminoácidos de la ID SEC N°: 4. Se contempla que en algunas circunstancias puede ser deseable un anticuerpo que se una a la IL-1 β o un fragmento que se una a la IL-1 β y tenga una constante de disociación relativamente más alta, por ejemplo para algunos métodos de tratamiento o prevención de enfermedades o estados relacionados con la IL-1 donde sea deseable un relativamente más bajo grado de afinidad.

Los anticuerpos que se describen en el contexto de la invención incluyen a los anticuerpos denominados AB1, AB2, AB3, AB4, AB5, AB6, AB7, AB8 y AB9. El AB1 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 4 y una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 9. El AB2 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 5 y una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 9. El AB3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 6 y una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 9. El AB4 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 7 y una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 9. El AB5 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 8 y una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 9. El AB6 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 14 y una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 10. El AB7 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 15 y una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 11. El AB8 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 25 y una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 10. El AB9 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 26 y una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 11.

La presente invención incluye a los anticuerpos que se unen a la IL-1 β o a los fragmentos que se unen a la IL-1 β y tienen una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia que se expone en la ID SEC N°: 15.

La invención también incluye a los anticuerpos que se unen a la IL-1 β o a los fragmentos que se unen a la IL-1 β y tienen una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia que se expone en la ID SEC N°: 11.

La presente también incluye a los anticuerpos para IL-1 β o a los fragmentos que se unen a la IL-1 β y comprenden la región variable de cadena pesada de la secuencia que se expone en la ID SEC N°: 15 y la región variable de cadena liviana de la secuencia que se expone en la ID SEC N°: 11.

La presente invención también incluye a los anticuerpos que se unen a la IL-1 β o a los fragmentos que se unen a la IL-1 β y comprenden partes que no se unen a la IL-1 β pero en lugar de ello son responsables de otras funciones, tales como la vida media circulante, el efecto citotóxico directo, el etiquetado detectable, o la activación de la cascada del

complemento endógena de un receptor o la citotoxicidad celular endógena. Los anticuerpos de la invención pueden comprender la totalidad o una parte de una región constante de un anticuerpo. La región constante puede ser seleccionada de entre cualesquiera isotipos, incluyendo los IgA (p. ej. IgA1 o IgA2), IgD, IgE, IgG (p. ej. IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), o IgM. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender una región de IgG2. Adicionalmente a o en lugar de comprender una región constante, los anticuerpos y fragmentos de la invención pueden incluir una marca de epítotope, un epítotope del receptor de salvamento, una mitad etiqueta a efectos diagnósticos o de purificación, o una mitad citotóxica tal como un radionúclido o una toxina.

En el contexto de la presente invención se describen composiciones farmacéuticas que comprenden cualesquiera de los anticuerpos que se unen a la IL-1 β o fragmentos que se unen a la IL-1 β y un soporte, excipiente o diluyente farmacéuticamente adecuado. Preferiblemente, los anticuerpos y compuestos de la invención pueden ser administrados en una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, en una cantidad suficiente para mejorar un signo o síntoma clínico de un estado o trastorno asociado a la expresión de la proteína diana, a un sujeto que tenga necesidad de tal tratamiento. En una realización afín, la composición farmacéutica adicionalmente comprende un segundo agente activo. En aun otra realización afín, se aporta la composición farmacéutica en la que el segundo agente activo es un anticuerpo para o un antagonista del factor de crecimiento o una citoquina. En otra realización el segundo agente activo es otro anticuerpo.

En el contexto de la presente invención se describe el uso de los anticuerpos para IL-1 β o de los fragmentos que se unen a la IL-1 β en la fabricación de un medicamento para prevenir un estado o trastorno asociado a la IL-1. En cualquiera de los usos, el medicamento puede ser coordinado con un tratamiento realizado usando un segundo agente activo. En otra realización de la invención se contempla el uso de una combinación sinérgica de un anticuerpo de la invención para la preparación de un medicamento para tratar a un paciente que presente síntomas de un estado o trastorno relacionado con la IL-1 de los que aquí se describen, donde el medicamento es coordinado con un tratamiento realizado usando un segundo agente activo. En una realización afín, el segundo agente activo es un anticuerpo para citoquina o antagonista de citoquina o un factor de crecimiento. Se contemplan realizaciones de cualquiera de los usos anteriormente mencionados donde la cantidad del anticuerpo o fragmento que se une a la IL-1 β en el medicamento está al nivel de una dosis efectiva para reducir la dosificación de segundo agente activo requerido para lograr un efecto terapéutico.

También se describen kits (kits = conjuntos de materiales y utensilios) en el contexto de la presente invención. En una realización, un kit comprende una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un compuesto o una composición de la invención (tal como un anticuerpo, un fragmento, un ácido nucleico, un vector o una célula) envasada en un envase, tal como un vial o una botella, y comprendiendo adicionalmente una etiqueta unida al envase o envasada con el mismo, describiendo la etiqueta el contenido del envase y dando la etiqueta indicaciones y/o instrucciones relativas al uso del contenido del envase para prevenir o reducir un estado o una enfermedad asociado(a) a la expresión de la proteína diana.

Breve descripción de las distintas vistas del dibujo (de los dibujos)

La Fig. 1 es un par de secuencias de aminoácidos que corresponden a las cadenas livianas y las cadenas pesadas de la región variable de algunos de los anticuerpos que aquí se describen. Las partes subrayadas de las secuencias de aminoácidos indican regiones determinantes complementarias (CDRs).

La Fig. 2 es un conjunto de secuencias de aminoácidos que corresponden a las regiones variables de cadena liviana y cadena pesada de los anticuerpos AB1, AB2, AB3 y AB4. Las partes subrayadas de las secuencias de aminoácidos indican regiones determinantes complementarias (CDRs).

La Fig. 3 es un conjunto de secuencias de aminoácidos que corresponden a las regiones variables de cadena liviana y cadena pesada de los anticuerpos AB5, AB5.1 y AB5.2. Las partes subrayadas de las secuencias de aminoácidos indican regiones determinantes complementarias (CDRs).

La Fig. 4 es un conjunto de secuencias de aminoácidos que corresponden a las regiones variables de cadena liviana y cadena pesada de los anticuerpos AB5.3 y AB5.4. Las partes subrayadas de las secuencias de aminoácidos indican regiones determinantes complementarias (CDRs).

La Fig. 4A es un conjunto de secuencias de aminoácidos que corresponden a las regiones variables de cadena liviana y cadena pesada de los anticuerpos AB6 y AB7. Las partes subrayadas de las secuencias de aminoácidos indican regiones determinantes complementarias (CDRs).

La Fig. 4B es un conjunto de secuencias de aminoácidos que corresponden a las regiones variables de cadena liviana y cadena pesada de los anticuerpos AB8 y AB9. Las partes subrayadas de las secuencias de aminoácidos indican regiones determinantes complementarias (CDRs).

La Fig. 5 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento de estimulación con IL-1 β *in vitro*.

La Fig. 6 es un histograma que muestra los resultados de un experimento con estimulación con IL-1 β *in vivo*.

La Fig. 7 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo cinético de exclusión para el anticuerpo denominado AB1.

La Fig. 8 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo cinético de exclusión para el anticuerpo denominado AB5.

La Fig. 9 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo cinético de exclusión para el anticuerpo denominado AB7.

La Fig. 10 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento de estimulación con IL-1 β *in vitro* para los anticuerpos denominados AB1, AB2 y AB3.

La Fig. 11 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento de estimulación con IL-1 β *in vitro* para los anticuerpos denominados AB1 y AB7.

La Fig. 12 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento de estimulación con IL-1 β *in vitro* para los anticuerpos denominados AB5 y AB7, así como para Kineret[®].

La Fig. 13 es un histograma que muestra los resultados de un experimento de estimulación con IL-1 β *in vivo* para los anticuerpos denominados AB5 y AB1.

La Fig. 14 es un histograma que muestra los resultados de un experimento de estimulación *in vivo* para los anticuerpos denominados AB5 y AB7.

La Fig. 15 es un Western blot que muestra los resultados de experimentos de reactividad cruzada para el anticuerpo denominado AB7 con IL-1 β de mono cynomolgus y macaco rhesus.

La Fig. 16 es un Western blot que muestra los resultados de experimentos de reactividad cruzada para el anticuerpo denominado AB7 con IL-1 β de perro, cobayo, cerdo y conejo.

La Fig. 17 es un Western blot que muestra los resultados de experimentos de reactividad cruzada para el anticuerpo denominado AB7 con IL-1 β recombinante humana, de ratón y de rata.

La Fig. 18 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento *in vitro* para el anticuerpo denominado AB7 y para Kineret que implica la producción de IL-8 inducida por IL-1.

La Fig. 19 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo efectuado para examinar si los presentes anticuerpos impiden que la IL-1 β se fije al receptor tipo I de IL-1.

La Fig. 20 es una ilustración de un ensayo realizado para examinar si los presentes anticuerpos impiden que la IL-1 β se fije al receptor tipo I de IL-1.

Descripción detallada

La presente invención incluye a nuevos anticuerpos y fragmentos para IL-1 β que tienen una deseable afinidad y potencia. Como un aspecto de la presente invención, se aportan anticuerpos que se unen a la IL-1 β y tienen una inesperadamente alta afinidad e inesperadamente bajas constantes de disociación (por ejemplo de menos de 3 pM, y como alternativa de aproximadamente 1 pM o menos) en comparación con los conocidos anticuerpos que se unen a la IL-1 β . Los ejemplos de anticuerpos incluyen al anticuerpo que aquí se denomina AB7.

La presente invención también incluye a los anticuerpos que se unen a la IL-1 β o a los fragmentos que se unen a la IL-1 β uniéndose selectivamente a la IL-1 β de forma tal que se unen a la IL-1 β con una afinidad mayor que aquella con la que lo hacen a otros antígenos. Los anticuerpos que se unen a la IL-1 β o los fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden unirse selectivamente a la IL-1 β humana, pero también se unen de manera detectable a IL-1 β no humana. Como alternativa o adicionalmente, los anticuerpos o fragmentos pueden unirse a la IL-1 β humana y a la IL-1 β de al menos otro mamífero (un primer mamífero) y no unirse a la IL-1 β de al menos otro mamífero (un segundo mamífero). Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos pueden unirse a uno o varios de los miembros del grupo que consta de IL-1 β de roedor, IL-1 β de primate, IL-1 β de perro e IL-1 β de conejo, y/o pueden no unirse a la IL-1 β de cobayo. Como alternativa o adicionalmente, los anticuerpos que se unen a la IL-1 β o los fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden tener la misma o prácticamente la misma potencia contra la IL-1 β humana y la IL-1 β de primate. Como alternativa o adicionalmente, los anticuerpos que se unen a la IL-1 β o los fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden tener la misma o prácticamente la misma potencia contra la IL-1 β humana recombinante y la IL-1 β humana endógena. Como alternativa o adicionalmente, los anticuerpos que se unen a la IL-1 β o los fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden neutralizar la IL-1 β de ratón.

En el sentido que se le da en la presente, la expresión “un anticuerpo o fragmento que se une específicamente a un antígeno diana” se refiere a un anticuerpo que se une al antígeno diana con una afinidad mayor que aquella con la que lo hace a antígenos similares. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento es específico de su antígeno afín

cuando las regiones variables del anticuerpo o fragmento reconocen al antígeno afín y se unen al mismo con una preferencia detectable (distinguiendo al antígeno de otros conocidos polipéptidos de la misma familia, en virtud de diferencias mensurables de la afinidad de fijación, a pesar de la posible existencia de identidad, homología o similitud secuencial localizada entre miembros de la familia). Se comprenderá que específicos anticuerpos y fragmentos pueden también interactuar con otras proteínas (como por ejemplo la proteína A de *S. aureus* u otros anticuerpos en técnicas de ELISA) mediante interacciones con secuencias situadas fuera de la región variable de los anticuerpos, y en particular en la región constante del anticuerpo o fragmento. Son perfectamente conocidos y se ponen rutinariamente práctica en la técnica ensayos de cribaje para determinar la especificidad de fijación de un anticuerpo. Para una amplia discusión de tales ensayos, véase Harlow *et al.* (Eds.), *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988), Capítulo 6.

Un aspecto de la presente invención incluye a los anticuerpos que se unen a la IL-1 β y a los fragmentos de los mismos que se unen a la IL-1 β y tienen inesperadamente bajas constantes de disociación (K_D), por ejemplo de menos de 3 pM, como alternativa de 2 pM o menos, como alternativa de 1 pM o menos, como alternativa de 0,8 pM o menos, como alternativa de 0,74 pM o menos, como alternativa de 0,72 pM o menos, como alternativa de 0,7 pM o menos, como alternativa de 0,6 pM o menos, como alternativa de 0,56 pM o menos, como alternativa de 0,5 pM o menos, como alternativa de 0,3 pM o menos, como alternativa de 0,26 pM o menos, como alternativa de 0,24 pM o menos, y como alternativa de 0,2 pM o menos. Así, en algunas realizaciones de la presente invención, los anticuerpos y fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden describirse haciendo referencia a un alto extremo de una gama de constantes de disociación. Adicionalmente o como alternativa, en algunas realizaciones de la presente invención, los anticuerpos y fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden describirse haciendo referencia a un bajo extremo de una gama de constantes de disociación, tal como por ejemplo un anticuerpo o fragmento que tenga una constante de disociación de 0,07 pM o más, como alternativa de 0,1 pM o más, como alternativa de 0,11 pM o más, como alternativa de 0,15 pM o más, como alternativa de 0,2 pM o más, como alternativa de 0,24 pM o más, como alternativa de 0,27 pM o más, como alternativa de 0,3 pM o más, como alternativa de 0,5 pM o más, o como alternativa de 0,7 pM o más. Pueden combinarse cualquier constante de disociación más alta y cualquier constante de disociación más baja, según lo especificado anteriormente, para definir una gama de constantes de disociación, siempre que el valor más bajo seleccionado sea igual al valor más alto seleccionado o menor que el mismo.

Los presentes anticuerpos y fragmentos se unen a la IL-1 β con alta afinidad, como la indicada por las constantes de disociación que aquí se exponen. Las constantes de afinidad que caracterizan las afinidades de los anticuerpos para los antígenos pueden ser constantes de asociación medidas por medio de la cinética de formación de complejos antígeno-anticuerpo. Como alternativa, la afinidad de fijación puede ser caracterizada por una constante de disociación que es la inversa de la constante de asociación. En el sentido en el que se la usa en la presente, la expresión K_D se refiere a la constante de disociación de una interacción de anticuerpo-antígeno.

La presente invención también incluye a los anticuerpos neutralizantes o a los fragmentos neutralizantes de los mismos que se unen a la IL-1 β para neutralizar la actividad biológica de la IL-1 β . La neutralización de la actividad biológica de la IL-1 β puede ser valorada mediante ensayos para la detección de uno o varios indicadores de la actividad biológica de la IL-1 β , tales como la liberación estimulada por IL-1 β de IL-6 de fibroblastos humanos u otras células humanas, la liberación inducida por IL-1 β de IL-8 de células de la sangre, o la proliferación inducida por IL-1 de células T colaboradoras. Preferiblemente, los anticuerpos y fragmentos de la presente invención que se unen a la IL-1 β neutralizan la actividad biológica de la IL-1 β que está en conexión con la función de señalización del receptor tipo I de IL-1 (IL-1RI) al que se une la IL-1 β .

En general, los anticuerpos y fragmentos neutralizantes de la presente invención pueden neutralizar la actividad biológica de la IL-1 β independientemente de si está bloqueada la fijación de la IL-1 β al receptor tipo I de IL-1. Más preferiblemente, los anticuerpos que se unen a la IL-1 β o los fragmentos que se unen a la IL-1 β neutralizan la actividad biológica de la IL-1 β uniéndose a la IL-1 β sin prácticamente impedir la fijación de la IL-1 β unida al receptor tipo I de IL-1. Una potencial ventaja de tales anticuerpos y fragmentos es la de que los mismos pueden unirse a la IL-1 β y neutralizarla permitiendo aún al mismo tiempo que la IL-1 β se fije al IL-1RI. Esto puede redundar en una efectiva reducción de la actividad biológica de la IL-1 α así como la de actividad biológica de la IL-1 β , puesto que hay menos sitios IL-1RI para que la IL-1 α se fije a los mismos. Así, los anticuerpos y fragmentos de la presente invención que se unen a la IL-1 β son útiles en los métodos en los que es deseable neutralizar la actividad biológica de la IL-1 *in vitro* e *in vivo*.

Los presentes anticuerpos o fragmentos pueden ser anticuerpos o fragmentos neutralizantes que se unan específicamente a epítipo de IL-1 β que afecte a la actividad biológica de la IL-1 β . Los presentes anticuerpos o fragmentos pueden unirse a un epítipo de IL-1 β sensible a la neutralización. Cuando un epítipo de IL-1 β sensible a la neutralización es fijado por uno de los presentes anticuerpos o fragmentos, el resultado es una pérdida de actividad biológica de la IL-1 β que contiene al epítipo.

En algunas realizaciones, los anticuerpos que se unen a la IL-1 β o los fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden tener una IC_{50} para inhibir la liberación estimulada por IL-1 β de IL-1 β de células de la sangre que sea de menos de 50 pM, como alternativa de aproximadamente 25 pM o menos, como alternativa de aproximadamente 10 pM o menos, o como alternativa de aproximadamente 2 pM o menos. La expresión " IC_{50} para inhibir la liberación estimulada por IL-1 β de IL-1 β de células de la sangre" se refiere a la concentración requerida para inhibir el 50% de la liberación de IL-8 mediante la estimulación de las células de la sangre con IL-1 β . Los ejemplos de anticuerpos incluyen al anticuerpo al que aquí se denomina AB7.

La presente invención también incluye a un anticuerpo que se une a la IL-1 β o un fragmento del mismo que se une a la IL-1 β y comprende una secuencia de aminoácidos modificada, donde el aminoácido modificado tiene una o al menos una sustitución, adición o delección de una secuencia de aminoácidos de partida de la región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 11 o de una secuencia de aminoácidos de partida de la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 15, donde el anticuerpo o fragmento modificado tiene la misma o prácticamente la misma afinidad y especificidad de unión al epítipo como la secuencia de aminoácidos de partida. Se contempla que pueden hacerse una o varias sustituciones, delecciones o adiciones a los anticuerpos que se unen a la IL-1 β o los fragmentos que se unen a la IL-1 β y que aquí se prevén, tales como anticuerpos o fragmentos que comprendan a una región variable de cadena liviana que comprenda la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 11 y una región de cadena pesada que comprenda la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 15, manteniendo al mismo tiempo la misma o prácticamente la misma la afinidad y especificidad de unión al epítipo del anticuerpo o fragmento de partida. Por ejemplo, la presente invención incluye a un anticuerpo que se une a la IL-1 β o un fragmento del mismo que se une a la IL-1 β y comprende una secuencia de aminoácidos modificada, donde la secuencia de aminoácidos modificada tiene una o al menos una sustitución, adición o delección de una secuencia de aminoácidos de partida que comprende la ID SEC N°: 11 o 15, donde el anticuerpo o fragmento modificado tiene la misma o prácticamente la misma afinidad y especificidad de unión al epítipo como la secuencia de aminoácidos de partida que comprende la ID SEC N°: 11 o 15. Se entiende por la frase “prácticamente la misma” afinidad que la constante de afinidad o de disociación según determinación efectuada como aquí se describe no se ve incrementada o decrementada en más de una variación inherente en el ensayo para un anticuerpo o fragmento que comprende una región de cadena variable que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 11 y una región de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 15, tal como la variación que se observa cuando el ensayo es llevado a cabo independientemente tres o más veces. Se entiende por la frase “prácticamente la misma” especificidad de unión al epítipo que la unión a una secuencia de aminoácidos que contiene al epítipo según determinación efectuada como aquí se describe está dentro de la variación inherente en el ensayo para un anticuerpo o fragmento que comprende una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 11 y una región de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 15, tal como la variación que se observa cuando el ensayo es efectuado independientemente tres o más veces. Cuando se habla de efectuar una comparación con un anticuerpo o fragmento que comprende una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 11 y una región de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 15, ello significa que la comparación debe hacerse entre la secuencia de aminoácidos modificada y la secuencia de aminoácidos de partida en la cual se hicieron una o varias sustituciones, delecciones o adiciones, siendo tal secuencia de partida idéntica a todos los otros aminoácidos.

Anticuerpos, Anticuerpos Humanizados y Anticuerpos Manipulados Para No Presentar Inmunogenicidad en los Humanos

Los anticuerpos de la presente invención que se unen a la IL-1 β pueden preverse en forma de anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAbs), anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados con CDR, anticuerpos plenamente humanos, anticuerpos de cadena única y/o anticuerpos biespecíficos, así como fragmentos, incluyendo variantes y derivados de los mismos, obtenidos mediante técnicas conocidas entre las cuales se incluyen, aunque sin carácter limitativo, la escisión enzimática, la síntesis de péptidos o las técnicas recombinantes.

Los anticuerpos comprenden en general dos polipéptidos de cadena pesada y dos polipéptidos de cadena liviana, si bien también se contemplan anticuerpos de dominio único que tengan una cadena pesada y una cadena liviana y anticuerpos de cadena pesada desprovistos de cadenas livianas. Hay cinco tipos de cadenas pesadas que se denominan alfa, delta, epsilon, gamma y mu, sobre la base de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de cadena pesada. Estos distintos tipos de cadenas pesadas dan lugar a cinco clases de anticuerpos, que son las IgA (incluyendo las IgA₁ e IgA₂), IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, incluyendo cuatro subclases de IgG, que son concretamente las IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. Hay también dos tipos de cadenas livianas, que son las llamadas kappa (κ) o lambda (λ) sobre la base de la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes. Un anticuerpo de longitud completa incluye un dominio constante y un dominio variable. La región constante no tiene que estar presente en un fragmento de un anticuerpo que se une al antígeno. Los fragmentos de un anticuerpo aquí descrito que se unen al antígeno pueden incluir a los fragmentos de anticuerpo Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v). Como se trata más detalladamente acerca del tema a continuación, los fragmentos que se unen a la IL-1 β incluyen a fragmentos de anticuerpo y polipéptidos fijadores de antígeno que se unen a la IL-1 β .

Cada una de las secuencias de cadena pesada y cadena liviana de un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al antígeno incluye una región variable con tres regiones determinantes complementarias (CDRs) así como regiones de entramado (FRs) que no son CDR. En el sentido en el que se las usa en la presente, las expresiones “cadena pesada” y “cadena liviana” significan la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena liviana, respectivamente, a no ser que se indique otra cosa. A las CDRs de cadena pesada se las denomina aquí CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3. A las CDRs de cadena liviana se las denomina aquí CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3. Las regiones variables y las CDRs en una secuencia de anticuerpo pueden ser identificadas (I) según las reglas generales que han sido desarrolladas en la técnica, o bien (II) alineando las secuencias contra una base de datos de regiones variables conocidas.

Los métodos para identificar estas regiones están descritos en Kontermann and Dubel, eds., *Antibody Engineering*, Springer, Nueva York, NY, 2001, y Dinarello *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley and Sons Inc., Hoboken, NJ, 2000. Las bases de datos de las secuencias de anticuerpos están descritas en y puede accederse a

las mismas a través de la base de datos “The Kabatman” en www.bioinf.org.uk/abs (mantenida por A.C. Martin del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular del University College de Londres, Londres, Inglaterra) y VBASE2 en www.vbase2.org, como se describe en Retter *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 33 (edición de la base de datos): D671-D674 (2005). El sitio de la red de la base de datos “Kabatman” también incluye reglas empíricas generales para identificar las CDRs. La expresión “CDR”, en el sentido en el que se la usa en la presente, es como se define en Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest*, 5ª ed., U.S. Department of Health and Human Services, 1991, a no ser que se indique otra cosa.

La presente invención incluye a los anticuerpos que se unen a la IL-1 β e incluyen dos cadenas pesadas de longitud completa y dos cadenas livianas de longitud completa. Como alternativa, los anticuerpos que se unen a la IL-1 β pueden ser constructos tales como anticuerpos de cadena única o “mini” anticuerpos que conservan actividad de unión a la IL-1 β . Tales constructos pueden ser preparados por métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, la clonación y ensamblaje mediados por PCR (PCR = reacción en cadena de la polimerasa) de anticuerpos de cadena única para expresión en *E. coli* (como se describe en Antibody Engineering. The practical approach series, J. McCafferty, H. R. Hoogenboom, and D. J. Chiswell, editors, Oxford University Press, 1996). En este tipo de constructo, las partes variables de las cadenas pesadas y livianas de una molécula de anticuerpo son amplificadas por PCR a partir de cDNA. Los amplicones resultantes son entonces ensamblados, por ejemplo, en un segundo paso de PCR, por medio de un DNA enlazador (DNA = ácido desoxirribonucleico) que codifica un enlazador proteína flexible que se compone de los aminoácidos Gly y Ser. Este enlazador permite que las partes variables de cadena pesada y cadena liviana se plieguen de forma tal que la bolsa de fijación del antígeno es regenerada y el antígeno es fijado con afinidades que son a menudo equiparables a las de la molécula progenitora de inmunoglobulina dimérica de longitud completa.

Los anticuerpos y fragmentos de la presente invención que se unen a la IL-1 β incluyen a variantes de los ejemplos de anticuerpos, fragmentos y secuencias que aquí se dan a conocer. Las variantes incluyen a péptidos y polipéptidos que comprenden una o varias sustituciones, delecciones y/o adiciones de secuencias de aminoácidos que tienen la misma o prácticamente la misma afinidad y especificidad de unión al epítipo como uno o varios de los ejemplos de anticuerpos, fragmentos y secuencias que aquí se dan a conocer. Así, las variantes incluyen a péptidos y polipéptidos que comprenden una o varias sustituciones, delecciones y/o adiciones de secuencias de aminoácidos en los ejemplos de anticuerpos, fragmentos y secuencias que aquí se dan a conocer, donde tales sustituciones, delecciones y/o adiciones no ocasionan considerables variaciones de la afinidad y especificidad de unión al epítipo. Por ejemplo, una variante de un anticuerpo o fragmento puede ser resultado de una o varias variaciones de un anticuerpo o fragmento que comprenda una o varias de las secuencias de aminoácidos de las ID SEC NÚMS.: 11 o 15, donde el anticuerpo o fragmento modificado tiene la misma o prácticamente la misma afinidad y especificidad de unión al epítipo como la secuencia de partida. Las variantes pueden darse de forma natural, tal como es el caso de las variantes alélicas o de corte y empalme, o bien pueden ser construidas artificialmente. Las variantes pueden prepararse a partir de las correspondientes moléculas de ácido nucleico que codifican dichas variantes. Las variantes de los presentes anticuerpos y fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden tener modificaciones en secuencias de aminoácidos de cadena liviana y/o pesada que se den de manera natural o sean introducidas mediante manipulación *in vitro* de secuencias nativas usando técnicas de DNA recombinante. Las variantes que se dan de manera natural incluyen a las variantes “somáticas” que son generadas *in vivo* en las correspondientes secuencias nucleotídicas de la línea germinal durante la generación de la respuesta de un anticuerpo a un antígeno foráneo.

Las variantes de los anticuerpos que se unen a la IL-1 β y de los fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden también ser preparadas mediante técnicas de mutagénesis. Por ejemplo, pueden introducirse cambios de aminoácidos aleatoriamente en toda la región codificadora de un anticuerpo y las variantes resultantes pueden ser cribadas con respecto a la afinidad de unión para la IL-1 β o con respecto a otra propiedad. Como alternativa, pueden introducirse cambios de aminoácidos en regiones seleccionadas de un anticuerpo para IL-1 β , tal como en las CDRs de cadena liviana y/o pesada, y/o en las regiones de entramado, y los anticuerpos resultantes pueden ser cribados con respecto a la unión a la IL-1 β o con respecto a alguna otra actividad. Los cambios de aminoácidos incluyen a una o varias sustituciones de aminoácidos en una CDR, yendo desde una única diferencia de aminoácido hasta la introducción de una pluralidad de permutaciones de aminoácidos dentro de una CDR dada, tal como la CDR3. En otro método, la contribución de cada residuo dentro de una CDR a la unión a la IL-1 β puede ser valorada sustituyendo al menos un residuo dentro de la CDR por alanina. Lewis *et al.* (1995), *Mol. Immunol.* 32: 1065-72. Los residuos que no sean óptimos para la unión a la IL-1 β pueden ser entonces cambiados a fin de determinar una secuencia más óptima. También están incluidas las variantes generadas mediante inserción de aminoácidos para incrementar el tamaño de una CDR, tal como la CDR3. Por ejemplo, las de la mayoría de las secuencias CDR3 de cadena liviana tienen una longitud de nueve aminoácidos. Las secuencias de cadena liviana en un anticuerpo que sean más cortas que nueve residuos pueden ser optimizadas para la unión a la IL-1 β mediante la inserción de apropiados aminoácidos para incrementar la longitud de la CDR.

También pueden prepararse variantes mediante “mezcla de cadenas” realizada con cadenas livianas o pesadas. Marks *et al.* (1992), *Biotechnology* 10: 779.83. Una única cadena liviana (o pesada) puede ser combinada con una biblioteca que tenga un repertorio de cadenas pesadas (o livianas), y la población resultante se somete a cribaje con respecto a una actividad deseada, tal como la unión a la IL-1 β . Esto permite el cribaje de una mayor muestra de distintas cadenas pesadas (o livianas) en combinación con una única cadena liviana (o pesada) en comparación con la que es posible con bibliotecas que comprendan repertorios de cadenas tanto pesadas como livianas.

Los anticuerpos y fragmentos de la presente invención que se unen a la IL-1 β incluyen a derivados de los ejemplos de anticuerpos, fragmentos y secuencias que aquí se dan a conocer. Los derivados incluyen a polipéptidos o péptidos o variantes, fragmentos o derivados de los mismos que han sido modificados químicamente. Los ejemplos incluyen a la unión covalente de uno o varios polímeros, tales como polímeros hidrosolubles, carbohidratos enlazados a N o enlazados a O, azúcares, fosfatos y/u otras moléculas de este tipo. Los derivados son modificados de una manera que es distinta de los péptidos o polipéptidos de partida que se dan de manera natural, radicando la diferencia ya sea en el tipo o bien en la ubicación de las moléculas unidas. Los derivados adicionalmente incluyen la delección de uno o varios grupos químicos que estén de manera natural presentes en el péptido o polipéptido.

Los anticuerpos y fragmentos de la presente invención que se unen a la IL-1 β pueden ser biespecíficos. Los anticuerpos o fragmentos biespecíficos pueden ser de varias configuraciones. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden parecerse a los anticuerpos (o fragmentos de anticuerpo) individuales, pero pueden tener dos sitios de unión a distintos antígenos (regiones variables). Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante técnicas químicas (Kranz *et al.* (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 78: 5807), mediante técnicas de “polidoma” (Pat. U.S. N° 4.474.893) o mediante técnicas de DNA recombinante. Los anticuerpos biespecíficos de la presente invención pueden tener especificidades de unión para al menos dos distintos epítopes, al menos uno de los cuales es un epítipo de IL-1 β . Los anticuerpos y fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden también ser heteroanticuerpos. Los heteroanticuerpos son dos o más anticuerpos o fragmentos de fijación de anticuerpo (Fab) unidos mutuamente, teniendo cada anticuerpo o fragmento una distinta especificidad.

Se contemplan para los presentes anticuerpos y fragmentos que se unen a la IL-1 β técnicas para crear versiones de DNA recombinante de las regiones de unión al antígeno de moléculas de anticuerpos que evitan la generación de anticuerpos monoclonales. El DNA es clonado en un sistema de expresión bacteriano. Un ejemplo de una técnica de este tipo que es adecuada para la puesta en práctica de esta invención hace uso de un sistema vector lambda bacteriófago que tiene una secuencia guía que hace que la proteína Fab expresada migre al espacio periplásmico (entre la membrana de la célula bacteriana y la pared celular) o sea secretada. Pueden generarse y cribarse rápidamente grandes números de fragmentos Fab funcionales para seleccionar aquéllos que se unan a la IL-1 β . Tales agentes que se unen a la IL-1 β (fragmentos Fab con especificidad para un polipéptido IL-1 β) quedan específicamente incluidos dentro de los anticuerpos y fragmentos de la presente invención que se unen a la IL-1 β .

Los presentes anticuerpos y fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden ser anticuerpos humanizados o anticuerpos manipulados para no presentar inmunogenicidad en los humanos. En el sentido que se le da en la presente, un anticuerpo humanizado, o un fragmento del mismo que se une al antígeno, es un polipéptido recombinante que comprende una parte de un sitio de un anticuerpo no humano que se une al antígeno y una parte de las regiones constantes y/o de entramado de un anticuerpo humano. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo manipulado para no presentar inmunogenicidad en los humanos es un anticuerpo no humano (p. ej. de ratón) que ha sido manipulado modificando (p. ej. delecionando, insertando o sustituyendo) aminoácidos en posiciones específicas para así reducir o eliminar toda detectable inmunogenicidad del anticuerpo modificado en un humano.

Los anticuerpos humanizados incluyen a anticuerpos quiméricos y anticuerpos injertados con CDR. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos que incluyen una región variable de anticuerpo no humano enlazada a una región constante humana. Así, en los anticuerpos quiméricos la región variable es en la mayoría de los casos no humana, y la región constante es humana. Se describen anticuerpos quiméricos y métodos para hacerlos en Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 81: 6841-6855 (1984), Boulianne *et al.*, Nature 312: 643-646 (1984) y en la Publicación de Solicitud al Amparo del PCT WO 86/01533. A pesar de que pueden ser menos inmunogénicos que un anticuerpo monoclonal de ratón, las administraciones de anticuerpos quiméricos han venido siendo asociadas a las respuestas inmunes humanas (HAMA) a la parte no humana de los anticuerpos. Los anticuerpos quiméricos pueden ser producidos cortando y empalmado los genes de una molécula de anticuerpo de ratón de apropiada especificidad de unión al antígeno junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de apropiada actividad biológica, tal como la capacidad de activar el complemento humano y mediar en la ADCC (ADCC = citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos). Morrison *et al.* (1984), Proc. Natl. Acad. Sci., 81: 6851; Neuberger *et al.* (1984), Nature, 312:604. Un ejemplo es la sustitución de una región Fc por la de un distinto isotipo.

Los anticuerpos injertados con CDR son anticuerpos que incluyen las CDRs de un anticuerpo “donante” no humano enlazadas a la región de entramado de un anticuerpo “receptor” humano. En general, los anticuerpos injertados con CDR incluyen más secuencias de anticuerpo humano que los anticuerpos quiméricos porque incluyen tanto secuencias de región constante como secuencias de región variable (de entramado) de anticuerpos humanos. Así por ejemplo, un anticuerpo humanizado injertado con CDR de la invención puede comprender una cadena pesada que comprenda una secuencia de aminoácidos contiguos (p. ej. de aproximadamente 5 o más, 10 o más o incluso 15 o más residuos de aminoácidos contiguos) de la región de entramado de un anticuerpo humano (como p. ej. la FR-1, la FR-2 o la FR-3 de un anticuerpo humano) u opcionalmente la mayor parte o la totalidad de toda la región de entramado de un anticuerpo humano. Se describen anticuerpos injertados con CDR y métodos para hacerlos en Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525 (1986), Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-327 (1988) y Verhoeyen *et al.*, Science, 239: 1534-1536 (1988). Métodos que pueden ser usados para producir anticuerpos humanizados también están descritos en las Patentes U.S. 4.816.567, 5.721.367, 5.837.243 y 6.180.377. Se considera que en comparación con los anticuerpos quiméricos los anticuerpos injertados con CDR es menos probable que induzcan una reacción inmune contra partes de anticuerpos no humanos. Sin embargo se ha descrito que las secuencias de entramado de los anticuerpos donantes son requeridas para la afinidad y/o especificidad de unión del anticuerpo donante, presumiblemente porque estas secuencias de entramado afectan al

plegamiento de la parte de unión al antígeno del anticuerpo donante. Por consiguiente, cuando secuencias de CDR no humanas donantes son injertadas a secuencias de entramado humanas inalteradas, el resultante anticuerpo injertado con CDR puede presentar, en algunos casos, pérdida de aidez de unión con respecto al anticuerpo donante no humano original. Véanse, p. ej., Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-327 (1988) y Verhoeven *et al.*, Science, 239: 1534-1536 (1988).

Los anticuerpos manipulados para no presentar inmunogenicidad en los humanos incluyen a los anticuerpos “revestidos” y a los anticuerpos preparados usando la tecnología HUMAN ENGINEERING^{MF} (MF = marca de fábrica) (XOMA (US) LLC, Berkeley, CA). La tecnología HUMAN ENGINEERING^{MF} está disponible comercialmente y supone alterar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo quimérico o de ratón, haciendo cambios específicos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo para producir un anticuerpo modificado con inmunogenicidad reducida en un humano, que sin embargo conserve las deseables propiedades de unión de los anticuerpos no humanos originales. En general, la técnica supone clasificar los residuos de aminoácidos de un anticuerpo no humano (p. ej. de ratón) como residuos “de bajo riesgo”, “de riesgo moderado” o “de alto riesgo”. La clasificación se lleva a cabo usando un cálculo de riesgo/recompensa global que evalúa los beneficios previstos de hacer una determinada sustitución (p. ej. para inmunogenicidad en humanos) contra el riesgo de que la sustitución afecte a las propiedades de plegamiento y/o fijación de antígeno del anticuerpo resultante. Así, una posición de bajo riesgo es una para la cual se prevea que una sustitución será beneficiosa porque se prevé que reducirá la inmunogenicidad sin afectar mucho a las propiedades de unión al antígeno. Una posición de riesgo moderado es una para la cual se prevea que una sustitución reducirá la inmunogenicidad, pero es más probable que afecte al plegamiento de la proteína y/o a la unión al antígeno. Las posiciones de alto riesgo contienen residuos que es sumamente probable que estén implicados en el correcto plegamiento o en la unión al antígeno. En general, las posiciones de bajo riesgo en un anticuerpo no humano son sustituidas con residuos humanos, las posiciones de alto riesgo son raramente sustituidas, y a veces se hacen, aunque no indiscriminadamente, sustituciones humanizantes en posiciones de riesgo moderado. Las posiciones con prolina en la secuencia de región variable de anticuerpo no humano son habitualmente clasificadas como posiciones de riesgo al menos moderado.

El residuo de aminoácido humano a ser sustituido en particular en una determinada posición de bajo riesgo o de riesgo moderado de una secuencia de anticuerpo no humano (p. ej. de ratón) puede ser seleccionado alineando una secuencia de aminoácidos de las regiones variables del anticuerpo no humano con la correspondiente región de una secuencia de anticuerpo humano específica o de consenso. Los residuos de aminoácidos en posiciones de bajo riesgo o de riesgo moderado en la secuencia no humana pueden usarse en sustitución de los correspondientes residuos en la secuencia de anticuerpo humano según la alineación. Las técnicas para hacer proteínas manipuladas humanas se describen más detalladamente en Studnicka *et al.*, Protein Engineering, 7: 805-814 (1994), en las Patentes U.S. 5.766.886, 5.770.196, 5.821.123 y 5.869.619, y en la Publicación de Solicitud WO 93/11794 al amparo del PCT.

Los anticuerpos “revestidos” son anticuerpos no humanos o humanizados (como p. ej. anticuerpos quiméricos o injertados con CDR) que han sido manipulados para sustituir ciertos residuos de aminoácidos expuestos al solvente para reducir adicionalmente su inmunogenicidad o acrecentar su función. Puesto que se presume que los residuos superficiales de un anticuerpo quimérico es menos probable que afecten al correcto plegamiento del anticuerpo y es más probable que provoquen una reacción inmune, el revestimiento de un anticuerpo quimérico puede incluir, por ejemplo, los pasos de identificar los residuos expuestos al solvente en la región de entramado no humana de un anticuerpo quimérico y sustituir al menos a uno de ellos con los correspondientes residuos superficiales de una región de entramado humana. El revestimiento puede llevarse a cabo mediante cualquier adecuada técnica de manipulación, incluyendo el uso de la tecnología HUMAN ENGINEERING^{MF} anteriormente descrita.

En un enfoque distinto, puede lograrse una recuperación de aidez de unión “deshumanizando” un anticuerpo injertado con CDR. La deshumanización puede incluir la restitución de residuos de regiones de entramado del anticuerpo donante al anticuerpo injertado con CDR, restituyendo con ello el correcto plegamiento. Puede lograrse una “deshumanización” similar a base de (I) incluir partes de la región de entramado “donante” en el anticuerpo “receptor” o (II) injertar partes de la región de entramado del anticuerpo “donante” en el anticuerpo receptor (junto con las CDRs donantes injertadas).

Para una adicional discusión de anticuerpos, anticuerpos humanizados, anticuerpos manipulados para no presentar inmunogenicidad en los humanos y métodos para su preparación, véase Kontermann y Dubel, redactores en jefe, *Antibody Engineering*, Springer, Nueva York, NY, 2001.

Los ejemplos de anticuerpos humanizados o manipulados para no presentar inmunogenicidad en los humanos incluyen a los anticuerpos IgG, IgM, IgE, IgA e IgD. Los presentes anticuerpos pueden ser de cualquier clase (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, etc.) o isotipo y pueden comprender una cadena liviana kappa o lambda. Por ejemplo, un anticuerpo humano puede comprender una cadena pesada o un fragmento definido de IgG, tal como al menos uno de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Como ejemplo adicional, los presentes anticuerpos o fragmentos pueden comprender una cadena pesada de IgG1 y una cadena liviana de IgG1.

Los presentes anticuerpos y fragmentos pueden ser anticuerpos humanos tales como anticuerpos que se unan a los polipéptidos IL-1 β y sean codificados por secuencias de ácido nucleico que sean variantes somáticas que se den de manera natural de secuencia de ácido nucleico de inmunoglobulina de la línea germinal, y fragmentos, variantes sintéticas, derivados y fusiones de los mismos. Tales anticuerpos pueden ser producidos por cualquier método conocido

en la técnica, tal como mediante el uso de mamíferos transgénicos (tales como ratones transgénicos) en los cuales el repertorio de inmunoglobulinas nativas ha sido sustituido con genes V humanos del cromosoma del mamífero. Tales mamíferos parecen realizar recombinación VDJ e hipermutación somática de los genes de anticuerpo de la línea germinal de manera normal, produciendo así anticuerpos de alta afinidad con secuencias completamente humanas.

Los anticuerpos humanos pueden también ser generados mediante el cribaje *in vitro* de bibliotecas de anticuerpos de presentación en fagos. Véanse Hoogenboom *et al.* (1991), J. Mol. Biol. 227: 381 y Marks *et al.* (1991), J. Mol. Biol. 222: 581. Han sido descritas y pueden ser preparadas fácilmente varias bibliotecas de presentación en fagos que contienen anticuerpos. Las bibliotecas pueden contener una diversidad de secuencias de anticuerpos humanos, tales como fragmentos Fab, Fv y scFv humanos, que pueden ser cribadas contra una diana apropiada. Las bibliotecas de presentación de fagos pueden comprender péptidos o proteínas que no sean anticuerpos, que pueden ser cribados para identificar agentes de unión selectiva a la IL-1 β .

Los anticuerpos y fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden comprender una o varias partes que no se unen a la IL-1 β pero que en lugar de ello sean responsables de otras funciones tales como la vida media circulante, el efecto citotóxico directo, el etiquetado detectable o la activación de la cascada del complemento endógena del receptor o la citotoxicidad celular endógena. Los anticuerpos o fragmentos pueden comprender la totalidad o una parte de la región constante y pueden ser de cualquier isotipo, incluyendo los IgA (p. ej. IgA1 o IgA2), IgD, IgE, IgG (p. ej. IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) o IgM. Además o en lugar de comprender una región constante, los compuestos de la invención que se unen al antígeno pueden incluir una marca de epítipo, un epítipo del receptor de salvamento, una mitad etiqueta a efectos diagnósticos o de purificación, o una mitad citotóxica tal como un radionúclido o una toxina.

La región constante (cuando esté presente) de los presentes anticuerpos y fragmentos puede ser del tipo γ 1, γ 2, γ 3, γ 4, μ , β 2 o δ o ϵ , preferiblemente del tipo γ , y más preferiblemente del tipo μ , mientras que la parte constante de una cadena liviana humana puede ser del tipo κ o λ (lo cual incluye a los subtipos λ 1, λ 2 y λ 3), pero es preferiblemente del tipo κ .

Las variantes también incluyen a los anticuerpos o fragmentos que comprenden una región Fc modificada, donde la región Fc modificada comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a la región Fc de tipo salvaje. La región Fc variante puede estar diseñada, con respecto a una molécula equiparable que comprenda la región Fc de tipo salvaje, para fijarse a los receptores Fc con mayor o menor afinidad.

Por ejemplo, los presentes anticuerpos y fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden comprender una región Fc modificada. La expresión "región Fc" se refiere a los polipéptidos sintéticos o que se dan de manera natural y son homólogos al dominio C-terminal de IgG que es producido al tener lugar la digestión con papaína de la IgG. El Fc de las IgG tiene un peso molecular de aproximadamente 50 kD. En los presentes anticuerpos y fragmentos puede usarse una región Fc entera, o solamente una parte acrecentadora de la vida media. Adicionalmente son aceptables muchas modificaciones de la secuencia de aminoácidos, puesto que no en todos los casos es necesaria o deseada la actividad nativa.

La región Fc puede ser mutada, si se desea, para inhibir su capacidad para fijar el complemento y fijarse al receptor Fc con alta afinidad. Para Fc de IgG murina, la sustitución de Glu 318, Lys 320 y Lys 322 por Ala hace que la proteína sea incapaz de dirigir la ADCC. La sustitución de Leu 235 por Glu inhibe la capacidad de la proteína para fijarse al receptor Fc con alta afinidad. También son conocidas varias mutaciones para las IgG humanas (véanse, p. ej., Morrison *et al.*, 1994, The Immunologist 2: 119 124 y Brekke *et al.*, 1994, The Immunologist 2: 125).

En algunas realizaciones, los presentes anticuerpos o fragmentos están provistos de una región Fc modificada donde una región Fc que se da de manera natural es modificada para incrementar la vida media del anticuerpo o fragmento en un ambiente biológico, tal como por ejemplo la vida media en suero o una vida media medida mediante un ensayo *in vitro*. También se describen en la Patente U.S. N° 6.998.253 métodos para alterar la forma original de una región Fc de una IgG.

En ciertas realizaciones puede ser deseable modificar el anticuerpo o fragmento a fin de incrementar su vida media en suero, por ejemplo añadiendo moléculas tales como PEG u otros polímeros hidrosolubles, incluyendo polímeros polisacáridos, a fragmentos de anticuerpo para incrementar la vida media. Esto puede también lograrse, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítipo de unión del receptor de salvamento al fragmento de anticuerpo (p. ej. mediante mutación de la región apropiada del fragmento de anticuerpo o bien incorporando el epítipo a una marca peptídica que es entonces fusionada con el fragmento de anticuerpo en cualquier extremo o en el centro, p. ej. mediante síntesis de péptidos o de DNA) (véase la Publicación Internacional N° WO 96/32478). La expresión "epítipo de unión del receptor de salvamento" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (p. ej. de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 que es responsable de incrementar la vida media en suero *in vivo* de la molécula de IgG).

Un epítipo de unión del receptor de salvamento puede incluir una región en la que cualquier residuo de aminoácido o varios residuos de aminoácidos cualesquiera de uno o dos bucles de un dominio Fc son transferidos a una posición análoga del fragmento de anticuerpo. Aun más preferiblemente, son transferidos tres o más residuos de uno o dos bucles del dominio Fc. Aun más preferiblemente, el epítipo se toma del dominio CH2 de la región Fc (p. ej. de una IgG) y se transfiere a la región CH1, CH3 o VH, o a más de una región de este tipo, del anticuerpo. Como alternativa, el epítipo se toma del dominio CH2 de la región Fc y se transfiere a la región CL o a la región VL, o a

ambas, del fragmento del anticuerpo. Véanse también las solicitudes internacionales WO 97/34631 y WO 96/32478, que describen variantes de Fc y su interacción con el receptor de salvamento.

La mutación de residuos dentro de sitios de fijación del receptor Fc puede redundar en una función efectora alterada, tal como una actividad de ADCC o de CDC (CDC = citotoxicidad dependiente del complemento) alterada, o una vida media alterada. Las potenciales mutaciones incluyen la inserción, delección o sustitución de uno o varios residuos, incluyendo la sustitución con alanina, una sustitución conservadora, una sustitución no conservadora o una sustitución con un correspondiente residuo de aminoácido en la misma posición de una distinta subclase de IgG (como p. ej. la sustitución de un residuo de IgG1 con un correspondiente residuo de IgG2 en esa posición). Por ejemplo se ha descrito que la mutación de la serina en la posición de aminoácido 241 en la IgG4 a prolina (que se encuentra en esa posición en la IgG1 y en la IgG2) condujo a la producción de un anticuerpo homogéneo, así como a una prolongación de la vida media en suero y a un mejoramiento de la distribución tisular en comparación con la IgG4 quimérica original. (Angal *et al.*, Mol Immunol. 30:105-8, 1993).

Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención no reacciona cruzadamente con diana alguna que no sea la IL-1 β . Por ejemplo, los presentes anticuerpos y fragmentos preferiblemente no se unen de manera detectable a la IL-1 α .

Anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a la IL-1 β

Los fragmentos de anticuerpo son partes de un anticuerpo intacto de longitud completa tales como una región variable o de unión al antígeno del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen a los miembros del grupo que consta de fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única (como p. ej. scFv); fragmentos de anticuerpo multiespecífico tales como anticuerpos biespecíficos, triespecíficos y multiespecíficos (como p. ej. diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos); minicuerpos; anticuerpos recombinantes quelantes; tricuerpos o bicuerpos; intracuerpos; nanocuerpos; pequeños productos inmunofarmacéuticos modulares (SMIP), proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión; anticuerpos camelizados; anticuerpos con contenido de V_{HH}; y cualesquiera otros polipéptidos hechos a base de fragmentos de anticuerpo.

La invención aporta un anticuerpo que se une a la IL-1 β o un fragmento del mismo que se une a la IL-1 β y comprende una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 11 y una región de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 15. ID SEC N°: 2.

Las Figs. 2, 3 y 4 exponen las regiones variables de cadena pesada y de cadena liviana de los anticuerpos que se describen en el contexto de la invención, cuyas secuencias corresponden a anticuerpos que aquí se denominan AB1, AB2, AB3, AB4, AB5, AB5.1, AB5.2, AB5.3 y AB5.4. Las secuencias AB5.1, AB5.2, AB5.3 y AB5.4 contienen posiciones variables, designadas como X1 y X2, en la región CDR3 de cadena pesada. Estas posiciones variables pueden ser cualesquiera de los aminoácidos indicados. Preferiblemente, X1 y X2 son respectivamente alanina y arginina, valina y arginina, fenilalanina y arginina, lisina y lisina, o asparagina y arginina.

El AB5.1 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 12 y una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 10. El AB5.2 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 13 y una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 11. El AB5.3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 23 y una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 10. El AB5.4 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 24 y una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 11.

La presente invención incluye a fragmentos de anticuerpo que se unen a la IL-1 β que comprenden las secuencias de cadena pesada o liviana de las ID SEC NÚMS.: 11 o 15 y se unen a la IL-1 β . En el sentido en el que se le usa en la presente, el vocablo "fragmentos" se refiere a cualesquiera 3 o más aminoácidos contiguos (como p. ej. 4 o más, 5 o más, 6 o más, 8 o más, o incluso 10 o más aminoácidos contiguos) del anticuerpo e incluye a los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v) o a las individuales regiones variables de cadena liviana o pesada o partes de las mismas. Los fragmentos que se unen a la IL-1 β incluyen, por ejemplo, a los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, F(v) y scFv. Estos fragmentos carecen del fragmento Fc de un anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación, y pueden tener menos fijación tisular inespecífica que un anticuerpo intacto. Véase Wahl *et al.* (1983), J. Nucl. Med. 24: 316-25. Estos fragmentos pueden producirse a partir de anticuerpos intactos usando métodos perfectamente conocidos, como por ejemplo mediante fragmentación proteolítica con enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂).

La presente invención incluye a anticuerpos que se unen a la IL-1 β y fragmentos de los mismos que se unen a la IL-1 β y comprenden una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 11 y una región de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 15 que se unen selectivamente al ligando IL-1 β pero permiten o permiten considerablemente la fijación del ligando IL-1 β unido al receptor tipo I de IL-1 (IL-1RI) (véanse el Ejemplo 14 y las Figs. 19 y 20). En contraste con muchos anticuerpos, entre los que se incluyen varios anticuerpos conocidos que se unen a la IL-1 β , el anticuerpo denominado AB7 se

une selectivamente al ligando IL-1 β , pero no bloquea o prácticamente no bloquea la unión de IL-1 β a IL-1RI, como se demuestra en la Ejemplo 14. Por ejemplo, el anticuerpo denominado AB7 se une a un epítipo de IL-1 β pero aún permite a la IL-1 β unirse a la IL-1RI. Así, la presente invención incluye a anticuerpos o fragmentos que se unen a la IL-1 β uniéndose a un epítipo de IL-1 β de forma tal que el anticuerpo o fragmento unido permite o permite considerablemente que la IL-1 β se fije al receptor I de IL-1 (IL-1RI), y el anticuerpo o fragmento se une a la IL-1 β humana con una constante de disociación de menos de 3 pM.

Están perfectamente descritos en la técnica ensayos *in vitro* y basados en células que están destinados a ser usados para determinar la fijación de IL-1 β al receptor tipo I de IL-1, incluyendo ensayos para efectuar dicha determinación en presencia de moléculas (tales como anticuerpos, antagonistas u otros inhibidores) que se unen a la IL-1 β o a la IL-1RI (véanse, por ejemplo, Evans *et al.*, (1995), J. Biol. Chem. 270:11477-11483; Vigers *et al.*, (2000), J. Biol. Chem. 275:36927-36933; Yanofsky *et al.*, (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93:7381-7386; Fredericks *et al.*, (2004), Protein Eng. Des. Sel. 17:95-106; Slack *et al.*, (1993), J. Biol. Chem. 268:2513-2524; Smith *et al.*, (2003), Immunity 18:87-96; Vigers *et al.*, (1997), Nature 386:190-194; Ruggiero *et al.*, (1997), J. Immunol. 158:3881-3887; Guo *et al.*, (1995), J. Biol. Chem. 270:27562-27568; Svenson *et al.*, (1995), Eur. J. Immunol. 25:2842-2850; Arend *et al.*, (1994), J. Immunol. 153:4766-4774). El receptor tipo I de IL-1 recombinante, incluyendo al receptor tipo I de IL-1 humana, para tales ensayos puede ser fácilmente obtenido de las de una variedad de fuentes comerciales (véase, por ejemplo, R&D Systems, SIGMA). El receptor tipo I de IL-1 también puede ser expresado a partir de un vector o constructo de expresión introducido en una apropiada célula huésped usando técnicas de transfección y biología molecular estándar que son conocidas en el ramo. El receptor tipo I de IL-1 expresado puede ser luego aislado y purificado para ser usado en ensayos de fijación, o para ser como alternativa usado directamente en una forma asociada a una célula.

Por ejemplo, la fijación de IL-1 β al receptor tipo I de IL-1 puede determinarse inmovilizando un anticuerpo que se una a la IL-1 β , poniendo a IL-1 β en contacto con el anticuerpo inmovilizado y determinando si la IL-1 β se fijó al anticuerpo, y poniendo a una forma soluble de IL-1RI en contacto con el complejo anticuerpo/IL-1 β fijado y determinando si la IL-1RI soluble se fijó al complejo. El protocolo puede también incluir el paso de poner a la IL-1RI soluble en contacto con el anticuerpo inmovilizado antes del contacto con IL-1 β , para confirmar que la IL-1RI soluble no se una al anticuerpo inmovilizado. Este protocolo puede ser llevado a cabo usando una máquina de medida Biacore® para análisis cinéticos de interacciones de unión. Un protocolo de este tipo puede también ser empleado para determinar si un anticuerpo u otra molécula permite o bloquea la fijación de IL-1 β al receptor tipo I de IL-1.

Para otros ensayos de fijación de IL-1 β /IL-1RI, puede determinarse si se permite o se bloquea la fijación de IL-1 β al receptor tipo I de IL-1 comparando la unión de IL-1 β a IL-1RI en presencia o en ausencia de anticuerpos para IL-1 β o fragmentos de los mismos que se unen a la IL-1 β . El bloqueo se identifica en la lectura del ensayo como una reducción designada de la fijación de IL-1 β al receptor tipo I de IL-1 en presencia de anticuerpos anti-IL-1 β o de fragmentos de los mismos que se unen a la IL-1 β , en comparación con una muestra de control que contiene el correspondiente tampón o diluyente pero no un anticuerpo para IL-1 β o un fragmento del mismo que se una a la IL-1 β . La lectura del ensayo puede verse cualitativamente como indicación de la presencia o ausencia de bloqueo, o puede verse cuantitativamente como indicación de una reducción porcentual o numérica de la fijación debida a la presencia del anticuerpo o fragmento.

Como alternativa o adicionalmente, cuando un anticuerpo que se une a la IL-1 β o un fragmento que se une a la IL-1 β bloquea considerablemente la fijación de IL-1 β al IL-1RI, la fijación de la IL-1 β al IL-1RI es reducida en al menos 10 veces, como alternativa en al menos aproximadamente 20 veces, como alternativa en al menos aproximadamente 50 veces, como alternativa en al menos aproximadamente 100 veces, como alternativa en al menos aproximadamente 1000 veces, o como alternativa en al menos aproximadamente 10000 veces o más, en comparación con la fijación de las mismas concentraciones de IL-1 β e IL-1RI en ausencia del anticuerpo o fragmento. Como otro ejemplo, cuando un anticuerpo que se une a la IL-1 β o un fragmento que se une a la IL-1 β permite considerablemente la fijación de IL-1 β al IL-1RI, la fijación de IL-1 β al IL-1RI es al menos aproximadamente un 90%, como alternativa de al menos aproximadamente un 95%, como alternativa de al menos aproximadamente un 99%, como alternativa de al menos aproximadamente un 99,9%, como alternativa de al menos aproximadamente un 99,99%, como alternativa de al menos aproximadamente un 99,999%, o como alternativa de al menos aproximadamente un 99,9999% de la fijación de las mismas concentraciones de IL-1 β e IL-1RI en ausencia del anticuerpo o fragmento, o bien y como alternativa es prácticamente idéntica a la misma.

Los residuos de aminoácidos clave (epítipo) que son fijados por un anticuerpo o fragmento que se une a la IL-1 β pueden determinarse usando un conjunto de péptidos de manera similar al método que se describe en el Ejemplo 11. Se sintetiza directamente sobre una membrana un conjunto de péptidos, tal como por ejemplo un conjunto de péptidos PepSpot^{FM} (JPT Peptide Technologies, Berlín, Alemania), donde un registro de doce péptidos de aminoácidos abarca toda la secuencia de aminoácidos de la IL-1 β , solapándose cada péptido en 11 aminoácidos con el anterior. La membrana que lleva los péptidos es luego explorada con el anticuerpo para el cual se busca la información de fijación al epítipo, por ejemplo a una concentración de 2 μ g/ml, por espacio de 2 h a temperatura ambiente. La fijación del anticuerpo a los péptidos unidos a la membrana puede ser detectada usando un anticuerpo secundario anti-humano de cabra (o de ratón, cuando ello sea apropiado) conjugado con HRP (HRP = peroxidasa de rábano), seguido por quimioluminiscencia mejorada (ECL). La (las) mancha(s) peptídica(s) que corresponden a determinados residuos o secuencias de aminoácidos de la proteína IL-1 β madura y puntúan positivamente para la fijación del anticuerpo son indicativas del epítipo fijado por el anticuerpo particular.

Pueden llevarse a cabo experimentos de competición de anticuerpos, y tales ensayos son perfectamente conocidos en la técnica. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo o fragmento se fija a un epítoto contenido en una secuencia peptídica que comprende los aminoácidos ESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIE, que corresponde a los residuos 83-105 de la proteína IL-1 β madura, un anticuerpo de especificidad desconocida puede ser comparado con el anticuerpo AB7 que constituye el ejemplo de la presente invención, del que se sabe que se fija a un epítoto contenido dentro de esta secuencia. Los ensayos de competición por la fijación pueden ser llevados a cabo por ejemplo usando un aparato de medida Biacore® para análisis cinéticos de las interacciones de fijación, o bien por ELISA. En un ensayo de este tipo, el anticuerpo de desconocida especificidad para el epítoto es evaluado en cuanto a su capacidad para competir por la fijación contra el anticuerpo comparador conocido (como p. ej. el AB7). La competición por la fijación a un epítoto en particular es determinada mediante una reducción de la fijación al epítoto de IL-1 β de al menos aproximadamente un 50%, o de al menos aproximadamente un 70%, o de al menos aproximadamente 80%, o de al menos aproximadamente un 90%, o de al menos aproximadamente un 95%, o de al menos aproximadamente un 90% o de al menos aproximadamente un 100% para el anticuerpo comparador conocido (como p. ej. el AB7) y es indicativa de la fijación a prácticamente el mismo epítoto.

En vista de la identificación en esta publicación de regiones que se unen a la IL-1 β en ejemplos de anticuerpos y/o epítopos que son reconocidos por los anticuerpos que se publican, se contempla que pueden generarse adicionales anticuerpos con similares características de fijación y utilidad terapéutica o diagnóstica que igualen a las realizaciones de esta publicación.

Además, los anticuerpos y fragmentos para IL-1 β de la presente invención incluyen a cualesquiera de las precedentes secuencias de aminoácidos de las cadenas livianas o pesadas con una o varias sustituciones conservadoras (p. ej. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 sustituciones conservadoras). A la luz de la presente exposición, pueden determinarse las posiciones de una secuencia de aminoácidos que sean candidatos para sustituciones conservadoras, y pueden seleccionarse aminoácidos sintéticos y que se den de manera natural que efectúen sustituciones conservadoras para cualesquiera aminoácidos en particular. Las consideraciones para seleccionar las sustituciones conservadoras incluyen el contexto en el cual se haga cualquier sustitución de aminoácidos en particular, la hidrofobicidad o polaridad de la cadena lateral, el tamaño general de la cadena lateral y el valor pK de las cadenas laterales con carácter ácido o básico bajo condiciones fisiológicas. Por ejemplo, la lisina, la arginina y la histidina son a menudo usadas adecuadamente en sustitución unas de otras. Como es sabido en la técnica, esto es debido al hecho de que los tres aminoácidos tienen las cadenas laterales básicas, mientras que los valores pK para las cadenas laterales de la lisina y de la arginina son mucho más próximos entre sí (de aproximadamente 10 y 12) que a la histidina (de aproximadamente 6). Análogamente, la glicina, la alanina, la valina, la leucina y la isoleucina son a menudo adecuadamente usadas en sustitución unas de otras, con la salvedad de que la glicina frecuentemente no es usada en adecuada sustitución de los otros miembros del grupo. Esto es debido al hecho de que cada uno de estos aminoácidos es relativamente hidrofóbico al ser incorporado a un polipéptido, pero la carencia de un carbono α de la glicina les deja a los ángulos phi y psi de rotación (en torno al carbono α) tanta libertad conformacional que los residuos glicinilo pueden provocar cambios de conformación o estructura secundaria que no se producen a menudo cuando los otros aminoácidos son usados en sustitución unos de otros. Otros grupos de aminoácidos que frecuentemente son usados en adecuada sustitución unos de otros incluyen, aunque sin carácter limitativo, al grupo que consta de los ácidos glutámico y aspártico, al grupo que consta de fenilalanina, tirosina y triptófano, y al grupo que consta de serina, treonina y opcionalmente tirosina.

Haciendo modificaciones conservadoras de la secuencia de aminoácidos o correspondientes modificaciones de los nucleótidos codificadores, pueden producirse anticuerpos que se unen a la IL-1 β o fragmentos que se unen a la IL-1 β y tienen características funcionales y químicas similares a las de los ejemplos de anticuerpos y fragmentos que aquí se dan a conocer. Por contraste, pueden lograrse considerables modificaciones de las características funcionales y/o químicas de los anticuerpos que se unen a la IL-1 β o de los fragmentos que se unen a la IL-1 β seleccionando sustituciones que se diferencien mucho en su efecto en el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal molecular en la zona de la sustitución, por ejemplo como conformación laminar o helicoidal, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral.

Los fragmentos de un anticuerpo que se fijan al antígeno incluyen a los fragmentos que conservan la capacidad de fijarse específicamente a un antígeno, generalmente reteniendo la parte del anticuerpo que se fija al antígeno. Está perfectamente establecido que la función de fijación al antígeno de un anticuerpo puede ser desempeñada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de las partes que se fijan al antígeno incluyen (I) un fragmento Fab, que es un fragmento monovalente que consta de los dominios VL, VH, CL y CH1; (II) un fragmento F(ab') $_2$, que es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra; (III) un fragmento Fd que es los dominios VH y CH1; (IV) un fragmento Fv que es los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; (V) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) Nature 341:544-546), que es un dominio VH; y (VI) una región determinante complementaria aislada (CDR). Los anticuerpos de cadena única están también comprendidos dentro de la expresión "parte de un anticuerpo que se fija al antígeno". Los anticuerpos y fragmentos de la presente invención que se unen a la IL-1 β también incluyen a dominios de fijación monovalentes o multivalentes o monoméricos o multiméricos (p. ej. tetaméricos) derivados de CDR con o sin un andamio (como por ejemplo un andamiaje de proteína o carbohidrato).

Los presentes anticuerpos o fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden ser parte de mayores moléculas de inmunoadhesión formadas por la asociación covalente o no covalente del anticuerpo o de la parte del anticuerpo con uno o varios otros péptidos o proteínas. Los ejemplos de tales moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región cen-

tral de la estreptavidina para hacer una molécula scFv tetramérica (Kipriyanov, S. M. *et al.* (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una marca de polihistidina C-terminal para hacer moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S. M. *et al.* (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058). Los anticuerpos y fragmentos que comprenden moléculas de inmunoadhesión pueden ser obtenidos usando técnicas de DNA recombinante, como aquí se describe. Las preferidas partes que se fijan al antígeno son dominios completos o parejas de dominios completos.

Los anticuerpos y fragmentos de la presente invención que se unen a la IL-1 β también incluyen a fragmentos de anticuerpo de dominio (dAb) (Ward *et al.*, Nature 341:544-546, 1989) que constan de un dominio V_H. Los anticuerpos y fragmentos de la presente invención que se unen a la IL-1 β también incluyen a diacuerpos, que son anticuerpos bivalentes en los cuales son expresados dominios V_H y V_L en una única cadena polipeptídica, pero usando un enlazador que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, obligando con ello a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de fijación al antígeno (véanse, p. ej., la EP 404.097; la WO 93/11161; Holliger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90:6444-6448, 1993, and Poljak *et al.*, Structure 2:1121-1123, 1994). Los diacuerpos pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

Los anticuerpos y fragmentos de la presente invención que se unen a la IL-1 β también incluyen a fragmentos de anticuerpo de cadena única (scFv) que se unen a la IL-1 β . Un scFv comprende una región variable de cadena pesada de anticuerpo (V_H) enlazada operativamente a una región variable de cadena liviana de anticuerpo (V_L) donde la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena liviana forman junta o individualmente un sitio de fijación que fija la IL-1 β . Un scFv puede comprender una región V_H en el extremo aminoterminal y una región V_L en el extremo carboxiterminal. Como alternativa, el scFv puede comprender una región V_L en el extremo aminoterminal y una región V_H en el extremo carboxiterminal. Además, a pesar de que los dos dominios del fragmento Fv, o sea el VL y VH, son codificados por genes independientes, los mismos pueden ser unidos, usando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que permite hacerlos como una única cadena de proteína en la cual las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (lo que se conoce como Fv de cadena única (scFv); véanse, p. ej. Bird *et al.* (1988) Science 242:423-426; and Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85:5879-5883).

Un scFv puede de manera opcional comprender adicionalmente un enlazador polipeptídico entre la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena liviana. Tales enlazadores polipeptídicos en general comprenden entre 1 y 50 aminoácidos, como alternativa entre 3 y 12 aminoácidos, y como alternativa 2 aminoácidos. Un ejemplo de un péptido enlazador para enlazar las cadenas pesada y liviana en un scFv comprende la secuencia de 5 aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (ID SEC N°: 37). Otro ejemplos comprenden una o varias repeticiones en tándem de esta secuencia (como por ejemplo un polipéptido que comprende de dos a cuatro repeticiones de Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (ID SEC N°: 37)) para crear enlazadores.

Los anticuerpos y fragmentos de la presente invención que se unen a la IL-1 β también incluyen a anticuerpos de cadena pesada (HCAb). Se dan excepciones a la estructura H₂L₂ de los anticuerpos convencionales en algunos tipos de las inmunoglobulinas que se encuentran en los camélidos (camellos, dromedarios y llamas; Hamers-Casterman *et al.*, 1993 Nature 363: 446; Nguyen *et al.*, 1998 J. Mol. Biol. 275: 413), en los tiburones alfombra (Nuttall *et al.*, Mol Immunol. 38:313-26, 2001), en los tiburones nodriza (Greenberg *et al.*, Nature 374:168-73, 1995; Rous *et al.*, 1998 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95: 11804), y en el pez rata moteado (Nguyen, *et al.*, "Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation", 2002 Immunogenetics 54(1): 39-47). Estos anticuerpos pueden aparentemente formar regiones de unión al antígeno usando solamente regiones variables de cadena pesada, por cuanto que estos anticuerpos funcionales son dímeros de cadenas pesadas solamente (a los que se denomina "anticuerpos de cadena pesada" o "HCAbs"). En consecuencia, algunas realizaciones de los presentes anticuerpos y fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden ser anticuerpos de cadena pesada (HCAb) que se unen específicamente a la IL-1 β . Por ejemplo, anticuerpos de cadena pesada que son una clase de IgG y están exentos de cadenas livianas son producidos por animales del género *Camelidae*, que incluye a los camellos, los dromedarios y las llamas (Hamers-Casterman *et al.*, Nature 363:446-448 (1993)). Los HCAbs tienen un peso molecular de aproximadamente 95 kDa en lugar del peso molecular de aproximadamente 160 kDa de los anticuerpos y IgG convencionales. Sus dominios de unión constan solamente de los dominios variables de cadena pesada, a los que a menudo se denomina V_{HH} para distinguirlos de los V_H convencionales. Muyldermans *et al.*, J. Mol. Recognit. 12: 131-140 (1999). Al dominio variable de los anticuerpos de cadena pesada se le denomina a veces nanocuerpo (Cortez-Retamozo *et al.*, Cancer Research 64:2853-57, 2004). Una biblioteca de nanocuerpos puede ser generada a partir de un dromedario inmunizado como se describe en Conrath *et al.*, (Antimicrob Agents Chemother 45: 2807-12, 2001) o usando métodos recombinantes.

Puesto que el primer dominio constante (C_{H1}) está ausente (eliminado por corte durante el procesamiento de mRNA debido a la pérdida de una señal consenso de corte y empalme), el dominio variable (V_{HH}) va inmediatamente seguido por la región bisagra y por los dominios C_{H2} y C_{H3} (Nguyen *et al.*, Mol. Immunol. 36:515-524 (1999); Woolven *et al.*, Immunogenetics 50:98-101 (1999)). El V_{HH} de camélido según se informa se recombina con regiones constantes de IgGs y de IgG3 que contienen dominios bisagra, CH2 y CH3 y carecen de un dominio CH1 (Hamers-Casterman *et al.*, *supra*). Por ejemplo, la IgG1 de llama es un isotipo de anticuerpo convencional (H₂L₂) en el cual el V_H se recombina con una región constante que contiene dominios bisagra, CH1, CH2 y CH3, mientras que la IgG2 y la IgG3 de llama son isotipos sólo de cadena pesada que carecen de dominios CH1 y no contienen cadenas livianas.

A pesar de que los HCAbs están desprovistos de cadenas livianas, tienen un repertorio de unión al antígeno. El mecanismo de generación genética de los HCAbs se estudia en Nguyen *et al.* Adv. Immunol 79:261-296 (2001) y

en Nguyen *et al.*, Immunogenetics 53:39-47 (2002). Los tiburones, incluyendo al tiburón nodriza, presentan similares dominios V monoméricos únicos con contenido de receptores del antígeno. Irving *et al.*, J. Immunol. Methods 248:31-45 (2001); Roux *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:11804 (1998).

5 Los V_{HH} s comprenden pequeños fragmentos intactos de unión al antígeno (como por ejemplo fragmentos que son de aproximadamente 15 kDa y de 118-136 residuos). Se ha descubierto que los dominios V_{HH} de camélido se unen al antígeno con alta afinidad (Desmyter *et al.*, J Biol. Chem. 276:26285-90, 2001), con afinidades de V_{HH} que están típicamente dentro de la gama nanomolar y son equiparables a la de los fragmentos Fab y scFv. Los V_{HH} s son altamente solubles y más estables que los correspondientes derivados de fragmentos scFv y Fab. Los fragmentos V_H
10 han venido siendo relativamente difíciles de producir en forma soluble, pero pueden obtenerse mejoramientos de la solubilidad y de la unión específica cuando los residuos de entramado son alterados para ser más tipo V_{HH} . Véase, por ejemplo, Reichmann *et al.*, J Immunol Methods 1999, 231:25-38). Los V_{HH} s llevan sustituciones de aminoácidos que los hacen más hidrofílicos e impiden la prolongada interacción con la BiP (proteína de unión a la cadena pesada de la inmunoglobulina), que normalmente se une a la cadena pesada en el Retículo Endoplásmico (ER) durante el
15 plegamiento y ensamblaje, hasta ser desplazada por la cadena liviana. Debido a la incrementada hidrofiliidad de los V_{HH} s, se ve mejorada la secreción desde el ER.

Pueden obtenerse V_{HH} s funcionales mediante fragmentación proteolítica de HCAb de un camélido inmunizado, mediante clonación directa de genes V_{HH} desde células B de un camélido inmunizado redundando en V_{HH} s recombinantes, o a partir de bibliotecas nativas o sintéticas. Pueden también obtenerse V_{HH} s con la especificidad antigénica deseada mediante la metodología de presentación de fagos. El uso de V_{HH} s en presentación de fagos es mucho más sencillo y más eficaz en comparación con los Fabs o con los scFvs, puesto que solamente tiene que clonarse y expresarse un dominio para obtener un fragmento funcional de unión al antígeno. Muyldermans, Biotechnol. 74:277-302 (2001); Ghahroudi *et al.*, FEBS Lett 414:521-526 (1997); y van der Linden *et al.*, J. Biotechnol. 80:261-270 (2000).
20 También se describen métodos para generar anticuerpos que tengan cadenas pesadas de camélido en las Publicaciones de Patente U.S. Núms. 200500136049 y 20050037421.

Pueden usarse métodos de presentación de ribosomas para identificar y aislar moléculas de scFv y/o V_{HH} que tengan la deseada actividad y afinidad de unión. Irving *et al.*, J. Immunol. Methods 248:31-45 (2001). La presentación
30 y selección de ribosomas tiene el potencial de generar y presentar grandes bibliotecas (10^{14}).

Otras realizaciones aportan moléculas tipo V_{HH} generadas por medio del proceso de camelización, a base de modificar V_H s no de *Camelidae*, tales como V_{HH} s humanos, para mejorar su solubilidad e impedir la unión no específica. Esto se logra sustituyendo residuos en el lado V_L s de los V_H s por residuos tipo V_{HH} , imitando con ello a los fragmentos
35 V_{HH} más solubles. Los fragmentos V_H camelizados, y en particular los basados en el entramado humano, se prevé que presenten una respuesta inmune reducida en gran medida al ser administrados *in vivo* a un paciente, y en consecuencia se prevé que tengan importantes ventajas para aplicaciones terapéuticas. Davies *et al.*, FEBS Lett. 339:285-290 (1994); Davies *et al.*, Protein Eng. 9:531-537 (1996); Tanha *et al.*, J. Biol. Chem. 276:24774-24780 (2001); y Riechmann *et al.*, Immunol. Methods 231:25-38 (1999).
40

Están disponibles los de una amplia variedad de sistemas de expresión para la producción de fragmentos de IL- 1β , incluyendo fragmentos Fab, scFv y V_{HH} s. Por ejemplo, pueden usarse sistemas de expresión de origen tanto procariótico como eucariótico para la producción a gran escala de fragmentos de anticuerpos y proteínas de fusión de anticuerpos. Son particularmente ventajosos los sistemas de expresión que permiten la secreción de grandes cantidades
45 de fragmentos de anticuerpo al medio de cultivo.

La producción de Fab-scFv biespecíficos ("bicuerpos") y Fab-(scFv)(2) triespecíficos ("tricuerpos") está descrita en Schoonjans *et al.* (J Immunol. 165:7050-57, 2000) y Willems *et al.* (J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 786:161-76, 2003). Para bicuerpos o tricuerpos, se fusiona una molécula scFv con una o ambas cadenas VL-CL (L) y VH-CH₁ (Fd), p. ej.; para producir un tricuerpo se fusionan dos scFvs con el C-terminal de Fab, mientras que en un bicuerpo se fusiona un scFv con el C-terminal de Fab. Un "minicuerpo" que consta de scFv fusionado con CH3 por medio de un enlazador peptídico (sin bisagra) o por medio de una bisagra de IgG ha sido descrito en Olafsen *et al.*, Protein Eng Des Sel. 2004 abr.; 17(4):315-23.
50

Los intracuerpos son anticuerpos de cadena única que manifiestan expresión intracelular y pueden manipular la función proteínica intracelular (Biocca, *et al.*, EMBO J 9:101-108, 1990; Colby *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 101:17616-21, 2004). Los intracuerpos, que comprenden secuencias señal celulares que mantienen al constructo de anticuerpo en las regiones intracelulares, pueden ser producidos como se describe en Mhashikar *et al* (EMBO J 14:1542-51. 1995) y Wheeler *et al.* (FASEB J 17:1733-5. 2003). Los transcuerpos son anticuerpos que permean la célula y en los cuales un dominio de transducción de proteínas (PTD) está fusionado con anticuerpos de fragmento variable de cadena única (scFv). Heng *et al.*, (Med Hypotheses, 64:1105-8, 2005).
60

Los anticuerpos y fragmentos de la presente invención que se unen a la IL- 1β también incluyen a anticuerpos que son SMIPs o proteínas de fusión de inmunoglobulina con dominio de unión específicas de la proteína diana. Estos constructos son polipéptidos de cadena única que comprenden dominios de unión al antígeno fusionados con dominios de inmunoglobulina necesarios para realizar funciones efectoras de anticuerpo. Véanse, p. ej., la WO 03/041600, la Publicación de Patente U.S. 20030133939 y la Publicación de Patente U.S. 20030118592.
65

Los anticuerpos y fragmentos de la presente invención que se unen a la IL-1 β también incluyen a inmunoadhesinas. Una o varias CDRs pueden ser incorporadas a una molécula ya sea covalentemente o bien no covalentemente para convertirla a una inmunoadhesina. Una inmunoadhesina puede incorporar la(s) CDR(s) como parte de una mayor cadena polipeptídica, puede enlazar covalentemente la(s) CDR(s) a otra cadena polipeptídica, o bien puede incorporar la(s) CDR(s) no covalentemente. Las CDRs que aquí se dan a conocer permiten que la inmunoadhesina se una específicamente a la IL-1 β .

Los anticuerpos y fragmentos de la presente invención que se unen a la IL-1 β también incluyen a miméticos de anticuerpos que comprenden una o varias partes que se unen a la IL-1 β y están construidas sobre un andamio orgánico o molecular (tal como un andamio de proteína o carbohidrato). Pueden usarse como reactivos para el diseño de miméticos de anticuerpos proteínas que tienen estructuras tridimensionales relativamente definidas, a las que comúnmente se denomina andamios de proteína. Estos andamios típicamente contienen una o varias regiones que se prestan a variación de secuencia específica o aleatoria, y tal aleatorización de secuencia es a menudo realizada para producir bibliotecas de proteínas de las cuales pueden seleccionarse los productos deseados. Por ejemplo, un mimético de anticuerpo puede comprender un polipéptido quimérico de unión no inmunoglobulina que tenga un dominio tipo inmunoglobulina que contenga andamio que tenga dos o más bucles expuestos al solvente que contenga una distinta CDR de un anticuerpo progenitor insertadas en cada uno de uno de los bucles y que presenten actividad de unión selectiva hacia un ligando fijado por el anticuerpo progenitor. Han sido propuestos andamios de proteína no inmunoglobulina para obtener proteínas con nuevas propiedades de unión. (Tramontano *et al.*, J. Mol. Recognit. 7:9, 1994; McConnell y Hoess, J. Mol. Biol. 250:460, 1995). Otras proteínas han sido probadas como andamios y han sido usadas para presentar residuos aleatorizados en superficies helicoidales alfa (Nord *et al.*, Nat. Biotechnol. 15:772, 1997; Nord *et al.*, Protein Eng. 8:601, 1995), bucles entre hélices alfa en haces en hélice alfa (Ku and Schultz, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 92:6552, 1995), y bucles constreñidos por puentes disulfuro, tales como los de los pequeños inhibidores de proteasa (Markland *et al.*, Biochemistry 35:8045, 1996; Markland *et al.*, Biochemistry 35:8058, 1996; Rottgen and Collins, Gene 164:243, 1995; Wang *et al.*, J. Biol. Chem. 270:12250, 1995). Se dan a conocer métodos para emplear andamios para miméticos de anticuerpos en la Patente US 5.770.380 y en las Publicaciones de patente US 2004/0171116, 2004/0266993 y 2005/0038229.

Así, puede generarse una variedad de anticuerpos y fragmentos que se unan a la IL-1 β y comprendan una, dos y/o tres CDRs de una región variable de cadena pesada de la ID SEC N°: 15 o una región variable de cadena liviana de la ID SEC N°: 11.

Los anticuerpos o fragmentos preferidos de la presente invención se unen a la IL-1 β con (I) una IC₅₀ de aproximadamente 0,5 nM o menos (p. ej. de aproximadamente 0,4 o menos, aproximadamente 0,3 o menos, o incluso aproximadamente 0,2 o menos), según determinación efectuada por inmunoanálisis ligados a enzimas (ELISA), (II) una afinidad al menos aproximadamente 100 veces (p. ej. al menos aproximadamente 150 veces, al menos aproximadamente 200 veces, o incluso al menos aproximadamente 250 veces) mayor con respecto a su unión a la IL-1 α (es decir que tienen una selectividad para IL-1 β con preferencia sobre la IL-1 α de al menos aproximadamente 100 veces (p. ej. de al menos aproximadamente 150 veces, de al menos aproximadamente 200 veces, o incluso de al menos aproximadamente 250 veces)), y/o (III) una constante de disociación de la unión en equilibrio (K_D) para IL-1 β de aproximadamente 20 pM o menos (p. ej. de aproximadamente 15 pM o menos, de aproximadamente 10 pM o menos, o incluso de aproximadamente 5 pM o menos). También son preferidos anticuerpos o fragmentos de la invención que pueden inhibir la expresión de IL-6 sérica inducida por IL-1 β en un animal en al menos un 50% (p. ej. en al menos un 60%, en al menos un 70%, o incluso en al menos un 80%) en comparación con el nivel de IL-6 sérica en un animal estimulado con IL-1 β al que no le ha sido administrado un anticuerpo o fragmento de la invención. En consecuencia, la invención aporta, en un aspecto afín, un anticuerpo que se une a la IL-1 β o un fragmento de anticuerpo que se une a la IL-1 β y tiene al menos una de las características anteriormente mencionadas.

A pesar de que la invención ha sido aquí descrita con respecto a los anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen a la IL-1 β (que comprenden p. ej. una cadena liviana y pesada), la invención también describe polipéptidos que no son anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen a la IL-1 β , tales como polipéptidos de cadena única (incluyendo polipéptidos de fusión, polipéptidos quiméricos, conjugados y polipéptidos similares). Así, en el contexto de la invención se describe un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las ID SEC NÚMS.: 15 u 11 o un fragmento o una variante de las mismas funcionalmente equivalente.

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que aquí se describen pueden ser preparados por cualquier método adecuado. Son conocidos en la técnica los métodos adecuados para preparar tales anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. Otros métodos para preparar los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos son como aquí se describe como parte de la invención. El anticuerpo, fragmento de anticuerpo o polipéptido de la invención, como aquí se describe, puede ser aislado o purificado en cualquier grado. En el sentido que aquí se le da, un compuesto aislado es un compuesto que ha sido separado de su ambiente natural. Un compuesto purificado es un compuesto cuya pureza ha sido incrementada, de forma tal que el compuesto existe en una forma que es más pura que aquélla en la que existe (I) en su ambiente natural o (II) al ser inicialmente sintetizado y/o amplificado bajo condiciones de laboratorio, siendo el vocablo "pureza" un término relativo que no necesariamente significa "pureza absoluta".

Cualesquiera de los anteriores anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o polipéptidos de la invención pueden ser humanizados o manipulados para ser de tipo humano, como aquí se describe.

Métodos de Preparación de los Anticuerpos o Fragmentos que se Unen a la IL-1 β

En el contexto de la invención se describe un método de preparación de un polipéptido madurado por afinidad que se une a la IL-1 β , tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (incluyendo una región de anticuerpo (como p. ej. una región variable de cadena pesada o cualquier parte de la misma, tal como una CDR)), cuyo método comprende los pasos de (a) prever un primer ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que se une a la IL-1 β y comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las ID SEC NÚMS.: 1-26 y un segundo ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que se diferencia de la primera secuencia de ácido nucleico en al menos un nucleótido, (b) llevar a cabo mezcla de ácidos nucleicos para proporcionar dos o más ácidos nucleicos mutados, y (c) seleccionar un ácido nucleico que codifique un polipéptido que (I) se una a la IL-1 β con una afinidad mayor que la del polipéptido codificado por el primer ácido nucleico, (II) tenga una selectividad para IL-1 β con preferencia sobre la IL-1 α que sea mayor que la del polipéptido codificado por el primer ácido nucleico, (III) tenga una constante de disociación de la unión en equilibrio (K_D) para IL-1 β que sea menor que la del polipéptido codificado por el primer ácido nucleico, o bien (IV) inhiba la expresión de IL-6 sérica inducida por IL-1 β en un animal en mayor grado que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico, y (d) expresar el ácido nucleico mutado seleccionado para proporcionar un polipéptido madurado por afinidad que se una a la IL-1 β . Preferiblemente, el polipéptido es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de los que aquí se describen como parte de la invención.

El método de preparación de un polipéptido madurado por afinidad para IL-1 β de manera opcional comprende adicionalmente la operación de repetir los pasos (b) y (c) una o varias veces, donde la mezcla de ácidos nucleicos del paso (b) es llevada a cabo usando (I) al menos un ácido nucleico mutado seleccionado del paso (c) y (II) al menos un ácido nucleico que tenga una secuencia de ácido nucleico que se diferencie del ácido nucleico mutado seleccionado en al menos un nucleótido. Preferiblemente se repiten los pasos (b) y (c) hasta haber sido seleccionado un ácido nucleico optimizado. Un ácido nucleico optimizado es seleccionado cuando ya no es posible seleccionar un ácido nucleico que codifique un polipéptido que tenga características de unión con respecto a la IL-1 β (como p. ej. las características (I)-(IV) del paso (c)) que sean superiores a las de un polipéptido codificado por un ácido nucleico anteriormente seleccionado.

Según lo deseable, se repiten los pasos (b) y (c) hasta haber sido seleccionado un ácido nucleico que codifique un polipéptido que tenga al menos una de las propiedades siguientes: (I) que se una a la IL-1 β con una IC_{50} de aproximadamente 0,5 nM o menos (p. ej. de aproximadamente 0,4 o menos, de aproximadamente 0,3 o menos, o incluso de aproximadamente 0,2 o menos), según determinación efectuada por inmunoanálisis ligado a enzimas (ELISA), (II) que se una a la IL-1 β con una afinidad al menos aproximadamente 100 veces (p. ej. al menos aproximadamente 150 veces, al menos aproximadamente 200 veces, o incluso al menos aproximadamente 250 veces) mayor con respecto a su unión a la IL-1 α (es decir, que tenga una selectividad para IL-1 β con preferencia sobre la IL-1 α de al menos aproximadamente 100 veces (p. ej. de al menos aproximadamente 150 veces, al menos aproximadamente 200 veces, o incluso de al menos aproximadamente 250 veces)), (III) que se una a la IL-1 β con una constante de disociación de la unión en equilibrio (K_D) para la IL-1 β de aproximadamente 20 pM o menos (p. ej. de aproximadamente 15 pM o menos, de aproximadamente 10 pM o menos, 5 pM o menos, 3 pM o menos, 2 pM o menos, 1 pM o menos, 0,7 pM o menos, 0,5 pM o menos, 0,3 pM o menos, o 0,2 pM o menos), o (IV) inhiba la expresión de IL-6 sérica inducida por IL-1 β en un animal en al menos un 50% (p. ej. en al menos un 60%, en al menos un 70%, o incluso en al menos un 80%) en comparación con el nivel de IL-6 sérica en un animal estimulado con IL-1 β al que no se le haya administrado un anticuerpo o fragmento de la invención.

La selección de un ácido nucleico mutado que codifique un polipéptido que tenga las propiedades deseadas puede ser llevada a cabo por cualquier método adecuado. Se dan a conocer aquí (véanse los Ejemplos) procedimientos para expresar polipéptidos codificados y someter a ensayo a los polipéptidos con respecto a la afinidad de unión, la selectividad de unión, las constantes de unión en equilibrio y la inhibición de la expresión de IL-6 inducida por IL-1 β . Son conocidos en la técnica otros métodos adecuados. Cuando el polipéptido codificado por el ácido nucleico mutado que se obtiene en el paso (b) no sea un anticuerpo o fragmento de anticuerpo completo (como p. ej. Fab), puede ser necesario prever un anticuerpo que comprenda al polipéptido a fin de determinar si el polipéptido satisface los criterios de selección. Así, el método de preparación de un polipéptido madurado por afinidad para IL-1 β puede comprender adicionalmente un paso de prever un anticuerpo que comprenda al polipéptido codificado por el ácido nucleico mutado, donde el paso de seleccionar el ácido nucleico mutado que codifique a un polipéptido que tenga las propiedades deseadas es llevado a cabo sometiendo al anticuerpo a ensayo.

En el sentido en el que se la utiliza en la presente, la expresión “mezcla de ácidos nucleicos” significa fragmentar dos o más secuencias de ácido nucleico para así obtener una combinación de fragmentos aleatorios de ácido nucleico y reensamblar los fragmentos para crear dos o más ácidos nucleicos mutados. A este respecto, un ácido nucleico mutado es meramente un ácido nucleico que tiene una secuencia de ácido nucleico que ha sido modificada. La mezcla de ácidos nucleicos puede ser llevada a cabo por cualquier método adecuado. Son conocidos en la técnica muchos métodos adecuados, tales como los que se describen en las Patentes U.S. 6.489.145; 6.773.900; 6.764.835; 6.740.506; 6.713.282; 6.713.281; 6.713.279; 6.709.841; 6.696.275; 6.677.115; 6.673.552; 6.656.677; 6.605.449; 6.566.050; 6.562.294; 6.555.315; 6.537.776; 6.528.249; 6.479.258; 6.455.254; 6.440.668; 6.368.798; 6.361.974; 6.358.709; 6.352.842; 6.344.328; 6.335.179; 6.280.926; 6.238.884; 6.174.673; 6.171.820; 6.168.919; 6.057.103; 6.054.267; 6.030.779; 6.001.574; 5.965.408; 5.958.672; 5.939.250; 5.763.239; 6.395.547; 6.376.246; 6.372.497; 6.368.861; 6.365.408;

6.365.377; 6.358.740; 6.358.742; 6.355.484; 6.344.356; 6.337.186; 6.335.160; 6.323.030; 6.319.714; 6.319.713; 6.303.344; 6.297.053; 6.291.242; 6.287.861; 6.277.638; 6.180.406; 6.165.793; 6.132.970; 6.117.679; 5.834.252; 5.830.721; 5.811.238; 5.605.793.

5 Ácidos Nucleicos

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención pueden ser codificados por un único ácido nucleico (como p. ej. un único ácido nucleico que comprende secuencias de nucleótidos que codifiquen los polipéptidos de cadena liviana y pesada del anticuerpo), o por dos o más ácidos nucleicos independientes que codifiquen cada uno de ellos una parte distinta del anticuerpo fragmento de anticuerpo. A este respecto, la invención aporta uno o varios ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los anteriores anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o polipéptidos (p. ej. cualquiera de las anteriores regiones variables de cadena liviana o pesada).

Según un aspecto de la invención, la invención aporta un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo o de una parte del mismo. Se aportan ejemplos de secuencias de ácido nucleico en las ID SEC NÚMS.: 39 y 40, que respectivamente codifican la región variable de cadena pesada de la ID SEC N°: 15 y la región variable de cadena liviana de la ID SEC N°: 11.

Como alternativa o adicionalmente, el ácido nucleico de la invención puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifique una región variable de cadena liviana de un anticuerpo o de una parte del mismo. A este respecto, la invención aporta un ácido nucleico que codifica un polipéptido (p. ej. una región variable de cadena liviana) que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 11.

Están también incluidos en la invención ácidos nucleicos que codifican cualesquiera de las anteriores secuencias de aminoácidos de las cadenas livianas o pesadas que comprenden una o varias sustituciones conservadoras (p. ej. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 sustituciones conservadoras), como se ha expuesto con respecto al anticuerpo y la fracción de anticuerpo de la invención, donde el anticuerpo o fragmento que comprende la sustitución tiene la misma o prácticamente la misma afinidad y especificidad de unión al epítipo como uno o varios de los ejemplos de anticuerpos, fragmentos y secuencias que aquí se dan a conocer.

Las secuencias de ácido nucleico pueden determinarse a partir de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpo y las regiones variables de cadena liviana o pesada que aquí se describen por cualquier método adecuado, tal como convirtiendo tales secuencias de aminoácidos en las correspondientes secuencias de ácido nucleico usando el código genético. Los ácidos nucleicos que codifican esas secuencias de aminoácidos (tales como las secuencias de aminoácidos que aquí se describen) pueden ser preparados (p. ej. las secuencias de ácido nucleico pueden ser aisladas o sintetizadas) usando métodos de los que son conocidos en la técnica, tales como los que se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, a Laboratory manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; Ausubet *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1994; y Herdewijn, ed., Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications (Methods in Molecular Biology), Humana Press; Totowa, NJ, 2004. Los ácidos nucleicos que aquí se describen pueden ser aislados o purificados en cualquier grado. En el sentido que se le da en la presente, un compuesto aislado es un compuesto que ha sido separado de su ambiente natural. Un compuesto purificado es un compuesto cuya pureza ha sido incrementada, de forma tal que el compuesto existe en una forma que es más pura que aquélla en la que existe (I) en su ambiente natural o (II) al ser inicialmente sintetizado y/o amplificado bajo condiciones de laboratorio, siendo el vocablo “pureza” un término relativo que no necesariamente significa “pureza absoluta”.

Los ácidos nucleicos pueden ser purificados usando las de una variedad de técnicas entre las que se incluyen, aunque sin carácter limitativo, la electroforesis en gel preparativa o la concentración isoeléctrica, la cromatografía de afinidad, de inmutafinidad o de intercambio iónico, la cromatografía de tamices moleculares, la cromatoconcentración o la cromatografía de líquidos de alta presión.

Vectores

Los ácidos nucleicos que aquí se describen pueden ser insertados en vectores, como p. ej. vectores de expresión de ácido nucleico y/o vectores de direccionamiento. Tales vectores pueden ser usados de varias maneras, p. ej. para la expresión de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se una a la IL-1 β en una célula o en un animal transgénico. En consecuencia, la invención aporta un vector que comprende cualquiera o varios de los ácidos nucleicos de la invención. Un “vector” es toda molécula o composición que tenga la capacidad de llevar una secuencia de ácido nucleico al interior de una adecuada célula huésped donde pueda tener lugar la síntesis del polipéptido codificado. Típicamente y con preferencia, un vector es un ácido nucleico que ha sido manipulado, usando técnicas de DNA recombinante que son conocidas en el ramo, para incorporar una deseada secuencia de ácido nucleico (p. ej. un ácido nucleico de la invención). Según lo deseable, el vector consta de DNA. Los ejemplos de adecuados vectores de transferencia génica basados en DNA incluyen a plásmidos y vectores virales. Los adecuados vectores virales incluyen, por ejemplo, a los miembros del grupo que consta de vectores basados en parvovirus (como p. ej. vectores basados en virus adenoasociados (AAV)), vectores retrovirales, vectores basados en virus herpes simplex (HSV), vectores quiméricos adenovirales-AAV, vectores basados en virus HIV y vectores basados en adenovirus. Cualesquiera de estos vectores pueden ser preparados usando técnicas de DNA recombinante estándar que se describen, p. ej., en

Sambrook *et al.*, *supra* y en Ausubel *et al.*, *supra*. Sin embargo son también conocidos en la técnica y pueden ser usados en conexión con la invención vectores que no están basados en ácidos nucleicos, tales como liposomas. El vector inventivo puede estar basado en un único tipo de ácido nucleico (como p. ej. un plásmido) o de molécula que no sea ácido nucleico (como p. ej. un lípido o un polímero). Como alternativa, el vector puede ser una combinación de un ácido nucleico y un ácido no nucleico (es decir, un vector “quimérico”). Por ejemplo, un plásmido que albergue al ácido nucleico puede ser combinado con un lípido o un polímero como vehículo de aporte. A un vector de este tipo se le denomina aquí “complejo plásmido-lípido” y complejo “plásmido-polímero”, respectivamente. El vector de transferencia génica inventivo puede estar integrado en el genoma de la célula huésped o puede estar presente en la célula huésped en forma de un episoma.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser insertados en vectores de expresión de inmunoglobulina, como por ejemplo los vectores que se describen en McLean *et al.*, Mol. Immunol., 37: 837-45 (2000); Walls *et al.*, Nucleic Acids Res., 21: 2921-9 (1993); y Norderhaug *et al.*, J. Immunol. Meth., 204: 77-87 (1997).

Los vectores son típicamente seleccionados para que sean funcionales en la célula huésped en la cual se usará el vector (para que el vector sea compatible con la maquinaria de la célula huésped de forma tal que pueda producirse una amplificación del gen y/o la expresión del gen). Una molécula de ácido nucleico que codifique un anticuerpo o fragmento que se une a la IL-1 β puede ser amplificada/expresada en células procarióticas, de levadura, de insecto (sistemas de baculovirus) y/o eucarióticas. La selección de la célula huésped dependerá en parte de si el anticuerpo o fragmento que se une a la IL-1 β debe ser modificado post-transicionalmente (de si debe ser p. ej. glicosilado y/o fosforilado). En caso afirmativo, son preferibles las células huésped de levadura, de insecto o de mamífero. Puede encontrarse adicional información acerca de los vectores de expresión en Meth. Enz. v. 185 (1990; Goeddel, ed.), Academic Press Inc., San Diego, Calif.

Los vectores de expresión típicamente contienen uno o varios de los componentes siguientes: un promotor, una o varias secuencias amplificadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación transcripcional, una secuencia intrón completa que contenga un sitio de corte y empalme de dador y aceptor, una secuencia guía para la secreción, un sitio de unión de ribosomas, una secuencia de poliadenilación, una región polienlazadora para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido a expresar, y un elemento marcador seleccionable.

Los componentes vector pueden ser homólogos (de la misma especie y/o cepa como la célula huésped), heterólogos (de una especie distinta de la especie o cepa de la célula huésped), híbridos (una combinación de distintas secuencias de más de una fuente), sintéticos, o secuencias nativas que normalmente funcionan regulando la expresión de inmunoglobulina. Las fuentes de componentes vector pueden ser cualquier organismo procariótico o eucariótico, cualquier organismo vertebrado o invertebrado o cualquier planta, siempre que los componentes sean funcionales y puedan ser activados por la maquinaria de la célula huésped.

Un origen de replicación se selecciona sobre la base del tipo de célula huésped que se use para la expresión. A título de ejemplo, el origen de replicación del plásmido pBR322 (Producto N° 303-3s, New England Biolabs, Beverly, Mass.) es útil para la mayoría de las bacterias gram-negativas, mientras que varios orígenes de SV40, polioma, adenovirus, virus de la estomatitis vesicular (VSV) o papillomavirus (tales como HPV o BPV) son útiles para clonar vectores en células de mamífero. Generalmente no se necesita el componente origen de replicación para vectores de expresión en mamíferos (por ejemplo, el origen SV40 se usan a menudo porque contiene el promotor inicial).

Una secuencia de terminación de la transcripción está típicamente situada en la posición 3' del extremo de un polipéptido que codifica regiones y sirve para terminar la transcripción. Las secuencias de terminación de la transcripción en células procarióticas a menudo comprenden un fragmento rico en G-C seguido por una secuencia poli T. Las secuencias de terminación de la transcripción pueden ser clonadas a partir de una biblioteca, pueden ser adquiridas comercialmente como parte de un vector, o pueden ser sintetizadas usando métodos para la síntesis de ácidos nucleicos tales como los anteriormente descritos.

Un elemento que es un gen marcador seleccionable codifica una proteína que es necesaria para la supervivencia y el crecimiento de una célula huésped cultivada en un medio de cultivo selectivo. Los típicos genes marcadores de selección codifican proteínas que (a) confieren resistencia a los antibióticos o a otras toxinas, como p. ej. la ampicilina, la tetraciclina o la canamicina para las células huésped procarióticas, (b) complementan las deficiencias auxotróficas de la célula, o bien (c) aportan nutrientes críticos que no proporciona el medio complejo. Son marcadores seleccionables preferidos el gen de resistencia a la canamicina, el gen de resistencia a la ampicilina y el gen de resistencia a la tetraciclina. Puede también usarse un gen de resistencia a la neomicina para la selección en células huésped procarióticas y eucarióticas.

Pueden usarse otros genes de selección para amplificar el gen que será expresado. La amplificación es un proceso en el que los genes de los que hay mayor demanda para la producción de una proteína decisiva para el crecimiento son reiterados en tándem dentro de los cromosomas de sucesivas generaciones de células recombinantes. Los ejemplos de marcadores seleccionables para células de mamífero incluyen la dihidrofolato reductasa (DHFR) y la timidina quinasa. Los transformantes de células de mamífero son puestos bajo una presión de selección a la que solamente los transformantes están singularmente adaptados para sobrevivir en virtud del marcador que está presente en el vector. La presión de selección se impone cultivando las células transformadas bajo condiciones en las cuales la concentración de agente de selección en el medio es sucesivamente variada, conduciendo con ello a la amplificación tanto del gen

de selección como del DNA que codifica un anticuerpo o fragmento para IL-1 β . Como resultado de ello, a partir del DNA amplificado son sintetizadas cantidades incrementadas de un anticuerpo.

Generalmente está presente un sitio de unión de ribosomas para iniciar la traducción de mRNA. Por ejemplo, un sitio de este tipo está caracterizado por una secuencia Shine-Dalgarno (procariotas) o una secuencia Kozak (eucariotas). El elemento está típicamente situado en posición 3' con respecto al promotor y en posición 5' con respecto a la secuencia codificadora del polipéptido a expresar. La secuencia Shine-Dalgarno es variada pero es típicamente una polipurina (que tiene un alto contenido de A-G). Han sido identificadas muchas secuencias Shine-Dalgarno, pudiendo ser cada una de ellas sintetizada fácilmente usando los métodos que se han expuesto anteriormente y usada en un vector procariótico.

Puede usarse una secuencia guía o señal para dirigir la secreción de un polipéptido. Una secuencia señal puede estar posicionada dentro o directamente en el extremo 5' de una región codificadora del polipéptido. Muchas secuencias señal han sido identificadas y pueden ser seleccionadas sobre la base de la célula huésped usada para la expresión. Una secuencia señal puede ser homóloga (que se da de manera natural) o heteróloga para una secuencia de ácido nucleico que codifique la proteína a expresar (tal como un fragmento de unión al anticuerpo antígeno). Una secuencia señal heteróloga seleccionada deberá ser una que sea reconocida y procesada (escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para células huésped procarióticas que no reconozcan ni procesen a una secuencia señal de anticuerpo nativo, la secuencia señal es sustituida por una secuencia señal procariótica seleccionada, por ejemplo, de entre los miembros del grupo que consta de fosfatasa alcalina, penicilinasas o guías de enterotoxina II termoestable. Para la secreción de levadura, una secuencia señal de anticuerpo nativo puede ser sustituida por invertasa de levadura, factor alfa o guías de ácido fosfatasa. En expresión en células de mamífero es generalmente satisfactoria la secuencia señal nativa, si bien pueden ser adecuadas otras secuencias señal de mamífero.

En la mayoría de los casos, la secreción de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno desde una célula huésped redundará en la eliminación del péptido señal del anticuerpo o fragmento. Así, el anticuerpo o fragmento maduro carecerá de toda secuencia guía o señal.

En algunos casos, tal como cuando se desee glicosilación en el sistema de expresión de una célula huésped eucariótica, pueden manipularse las distintas presecuencias para mejorar la glicosilación o producción. Por ejemplo, puede alterarse el sitio de corte para la peptidasa de un péptido señal, o pueden añadirse prosequencias, lo cual también puede afectar la glicosilación. El anticuerpo o fragmento final puede tener en la posición -1 (con respecto al primer aminoácido de la proteína madura) uno o varios aminoácidos adicionales que incidan en la expresión y que pueden no haber sido totalmente eliminados. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento final puede tener uno o dos aminoácidos que se encuentren en el sitio de corte para la peptidasa, unidos al N-terminal. Como alternativa, el uso de algunos sitios de corte para enzimas puede redundar en una forma ligeramente truncada del anticuerpo o fragmento deseado, si la enzima efectúa el corte en una zona de este tipo dentro del anticuerpo o fragmento maduro.

Los vectores de expresión típicamente contendrán un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está operativamente enlazado a una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo que se une a la IL-1 β o fragmento que se une al antígeno. Puede usarse un promotor nativo o heterólogo, en dependencia de la célula huésped que se use para la expresión y de la producción que se desee.

Los promotores destinados a ser usados con huéspedes procarióticos incluyen a los miembros del grupo que consta de sistemas promotores de beta-lactamasa y lactosa; fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (trp); y promotores híbridos tales como el promotor tac. Son también adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Sus secuencias han sido publicadas, y los mismos pueden ser ligados a una secuencia de ácido nucleico deseada o a las deseadas secuencias de ácido nucleico, usando los enlazadores o adaptadores que sean deseables para proporcionar sitios de restricción.

Son también conocidos en la técnica promotores destinados a ser usados con huéspedes de levadura. Se usan ventajosamente potenciadores de levadura con promotores de levadura. Son perfectamente conocidos promotores que son adecuados para ser usados con células huésped de mamífero, y los mismos incluyen a los obtenidos de los genomas de virus tales como poliomavirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tales como el Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y con la máxima preferencia el Virus de Simio 40 (SV40). Otros adecuados promotores de mamífero incluyen a promotores heterólogos de mamífero, como p. ej. promotores de shock térmico y el promotor de actina.

Los adicionales promotores que pueden ser usados para expresar los agentes de unión selectiva de la invención incluyen, aunque sin carácter limitativo, a los siguientes: la región promotora inicial de SV40 (Bemoist y Chambon, Nature, 290:304-310, 1981); el promotor CMV; el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma del Rous (Yamamoto *et al.* (1980), Cell 22: 787-97); el promotor de timidina quinasa del herpes (Wagner *et al.* (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1444-5); las secuencias reguladoras del gen de metalotionina (Brinster *et al.*, Nature, 296: 39-42, 1982); vectores de expresión procariótica tales como el promotor de beta-lactamasa (Villa-Kamaroff *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75: 3727-3731, 1978); o el promotor tac (DeBoer *et al.* (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 21-5). También son de interés las siguientes regiones de control transcripcional animal que presentan especificidad tisular y han sido utilizadas en animales transgénicos: la región de control del gen de elastasa I que es activa en células acinares pancreáticas (Swift *et al.* (1984), Cell 38: 639-46; Omitz *et al.* (1986), Cold

Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50: 399-409; MacDonald (1984), *Hepatology* 7: 425-515); la región de control del gen de insulina que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan (1985), *Nature* 315: 115-22); la región de control del gen de inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl *et al.* (1984), *Cell* 38: 647-58; Adames *et al.* (1985), *Nature* 318: 533-8; Alexander *et al.* (1987), *Mol. Cell. Biol.* 7: 1436-44); la región de control del virus del tumor mamario de ratón que es activa en células testiculares, de mama, linfoides y troncales (Leder *et al.* (1986), *Cell* 45: 485-95), la región de control del gen de albúmina que es activa en el hígado (Pinkert *et al.* (1987), *Genes y Devel.* 1: 268-76); la región de control del gen de alfa-fetoproteína que es activa en el hígado (Kumlauf *et al.* (1985), *Mol. Cell. Biol.* 5: 1639-48; Hammer *et al.* (1987), *Science*, 235: 53-8); la región de control del gen de alfa 1-antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey *et al.* (1987), *Genes y Devel.* 1: 161-71), la región de control del gen de beta-globina que es activa en la células mieloides (Mogam *et al.*, *Nature*, 315 338-340, 1985; Kollias *et al.* (1986), *Cell* 46: 89-94); la región de control del gen de la proteína básica mielina, que es activa en células oligodendrocíticas en el cerebro (Readhead *et al.* (1987), *Cell*, 48: 703-12); la región de control del gen de la cadena liviana 2 de miosina, que es activa en el músculo esquelético (Sani (1985), *Nature*, 314: 283-6); y la región de control del gen de la hormona de liberación gonadotrópica, que es activa en el hipotálamo (Mason *et al.* (1986), *Science* 234: 1372-8).

Puede insertarse una secuencia potenciadora en el vector para incrementar la transcripción en células huésped eucarióticas. Son conocidas varias secuencias potenciadoras que pueden ser obtenidas de genes de mamífero (como p. ej. globina, elastasa, albúmina, alfa-feto-proteína e insulina). Sin embargo, típicamente se usará un potenciador de un virus. El potenciador de SV40, el potenciador del promotor inicial de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus y potenciadores de adenovirus son ejemplos de elementos potenciadores para activación de promotores eucarióticos.

Mientras que un potenciador puede ser empalmado en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a la región codificadora del polipéptido, el mismo está típicamente situado en un sitio 5' con respecto al promotor.

Los vectores para expresar ácidos nucleicos incluyen a los que son compatibles con células huésped bacterianas, de insecto y de mamífero. Tales vectores incluyen, *inter alia*, a los miembros del grupo que consta de pCRII, pCR3 y pCDNA3.1 (Invitrogen Company, San Diego, Calif.), pBSII (Stratagene Company, La Jolla, Calif.), pET15 (Novagen, Madison, Wis.), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, Calif.), pETL (BlueBacII; Invitrogen), pDSR-alfa (Publicación PCT N° WO 90/14363) y pFastBacDual (Gibco/BRL, Gran Island, N.Y.).

Los posibles vectores adicionales incluyen, aunque sin carácter limitativo, a los miembros del grupo que consta de cósmidos, plásmidos o virus modificados, pero el sistema vector debe ser compatible con la célula huésped seleccionada. Tales vectores incluyen, aunque sin carácter limitativo, a plásmidos tales como derivados de plásmido Bluescript® (un fagémido basado en CoIE1 de alto número de copias, Stratagene Cloning Systems Inc., La Jolla Calif.), plásmidos de clonación para PCR diseñados para clonar productos de PCR amplificados con Taq (como p. ej. TOPO^{MF}. TA Cloning® Kit, derivados de plásmido PCR:1, Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores de mamífero, levadura o virus tales como un sistema de expresión de baculovirus (derivados de plásmido pBacPAK, Clontech, Palo Alto, Calif.). Las moléculas recombinantes pueden ser introducidas en células huésped mediante técnicas de transformación, transfección, infección o electroporación u otras técnicas conocidas.

Células Huésped y Usos de las Mismas

La invención adicionalmente aporta una célula (como p. ej. una célula aislada o purificada) que comprende un ácido nucleico o vector de la invención. La célula puede ser cualquier tipo de célula, con la excepción de una célula ovárica fertilizada humana o una célula troncal embrionaria humana, siendo la célula capaz de ser transformada con el ácido nucleico o vector de la invención para así producir un polipéptido codificado por el mismo. La célula es preferiblemente la célula de un mamífero, tal como un humano, y es más preferiblemente una célula de hibridoma, una célula troncal embrionaria o un óvulo fertilizado.

Para expresar el anticuerpo o fragmento que se une a la IL-1 β , DNAs que codifican cadenas livianas y pesadas de longitud parcial o completa, obtenidos como se ha descrito anteriormente, son insertados en vectores de expresión de forma tal que los genes queden operativamente enlazados a secuencias de control transcripcional y traduccional. En este contexto, la expresión "operativamente enlazado" tiene el significado de que un gen de anticuerpo es ligado en un vector de forma tal que las secuencias de control transcripcional y traduccional dentro del vector sirven para desempeñar su pretendida función de regular la transcripción y traducción del gen de anticuerpo. Las secuencias de vector de expresión y de control de expresión se eligen para que sean compatibles con la célula huésped de expresión que se use. El gen de cadena liviana de anticuerpo y el gen de cadena pesada de anticuerpo pueden ser insertados en vectores independientes, o más típicamente ambos genes son insertados en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo son insertados en el vector de expresión mediante métodos estándar (como p. ej. la ligación de sitios de restricción complementarios en el vector y fragmento de gen de anticuerpo, o la ligación de extremos romos si no están presentes sitios de restricción). Antes de la inserción de las secuencias de cadena liviana o pesada, el vector de expresión puede ya llevar secuencias de región constante de anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque para convertir las secuencias VH y VL seleccionadas en genes de anticuerpo de longitud completa es el de insertarlas en vectores de expresión que ya codifiquen regiones constantes de cadena pesada y regiones constantes de cadena liviana, respectivamente, de forma tal que el segmento VH quede enlazado operativamente al segmento o a los segmentos CH dentro del vector y que el segmento VL quede enlazado operativamente al segmento CL dentro del vector. Adicionalmente o como alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilite la secreción de

la cadena de anticuerpo desde una célula huésped. El gen de la cadena de anticuerpo puede ser clonado en el vector de forma tal que el péptido señal quede enlazado en marco al terminal amino del gen de la cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden llevar secuencias reguladoras que controlen la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula huésped. En la expresión "secuencia reguladora" se pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (como p. ej. señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Tales secuencias reguladoras están descritas, por ejemplo, en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Se comprenderá 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 proteína deseado y otras consideraciones. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión en células huésped de mamífero incluyen a elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero.

Además de los genes de cadena de anticuerpo y de las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulen la replicación del vector en células huésped (como p. ej. orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las cuales ha sido introducido el vector (véanse, p. ej., las Patentes U.S. Núms. 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, que son todas de Axel *et al.*). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la cual ha sido introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen al gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped DHFR con amplificación/selección de metotrexato) y el gen neo (para selección para G418).

Los métodos para introducir ácidos nucleicos y vectores en células aisladas y el cultivo y la selección de células huésped transformadas *in vitro* son conocidos en la técnica e incluyen el uso de transformación mediada por cloruro cálcico, transducción, conjugación, apareamiento triparental, DEAE, transfección mediada por dextrano, infección, fusión de membranas con liposomas, bombardeo de alta velocidad con microproyectiles recubiertos con DNA, microinyección directa en células individuales y electroporación (véanse, p. ej., Sambrook *et al.*, *supra*; Davis *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology, 2ª ed., McGraw-Hill Professional, 1995; y Neumann *et al.*, EMBO J., 1: 841 (1982)).

La célula que comprende el ácido nucleico o vector de la invención puede ser usada para producir el anticuerpo o fragmento del mismo que se une a la IL-1 β , o una parte del mismo (como p. ej. una secuencia de cadena pesada o una secuencia de cadena liviana codificada por el ácido nucleico o vector). Tras haber introducido el ácido nucleico o vector de la invención en la célula, la célula es cultivada bajo condiciones adecuadas para la expresión de la secuencia codificada. El anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la parte del anticuerpo puede ser luego aislado(a) de la célula.

En ciertas realizaciones pueden ser introducidos en la célula dos o más vectores que juntamente codifiquen un anticuerpo que se une a la IL-1 β o un fragmento del mismo que se une al antígeno. Por ejemplo, puede ser introducido en una célula huésped un primer vector que codifique una región variable de cadena pesada o una secuencia de cadena pesada completa, y también se introduce en la célula huésped un segundo vector que codifique una región variable de cadena liviana o una secuencia de cadena liviana completa. La célula es luego cultivada bajo condiciones adecuadas para la expresión de las dos secuencias codificadas por los vectores primero y segundo, y los polipéptidos codificados pueden ser aislados de la célula huésped. De ser necesario, los polipéptidos aislados pueden ser luego combinados bajo condiciones que promuevan su asociación y organización para constituir un anticuerpo que se una a la IL-1 β o un fragmento del mismo que se una al antígeno. Como alternativa, los vectores primero y segundo pueden ser introducidos en células independientes, y los productos pueden ser aislados de las respectivas células y combinados para así obtener un anticuerpo que se una a la IL-1 β o un fragmento del mismo que se una al antígeno. Han sido descritos en la técnica métodos para promover la asociación y organización de constituyentes de anticuerpos para formar polipéptidos que se unen a antígenos. Análogamente son conocidos para los expertos en la materia métodos para aislar un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno del mismo o fragmentos de cadena pesada y de cadena liviana.

Pueden usarse para generar un animal no humano transgénico células troncales embrionarias u óvulos fertilizados (con la excepción de las células troncales embrionarias humanas o los óvulos fertilizados humanos) que comprendan un ácido nucleico o vector de la invención. Métodos para hacer animales transgénicos están descritos en Hofker *et al.*, Transgenic Mouse: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology), Humana Press, Clifton, NJ, 2002. Los animales no humanos transgénicos que comprendan un ácido nucleico o vector de los que aquí se dan a conocer pueden ser usados para expresar el anticuerpo codificado, el fragmento de unión al antígeno o la parte del anticuerpo. El anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o la parte pueden ser luego aislados del animal. Partes de un anticuerpo pueden posteriormente ser reconstituidas (en combinación con adicionales partes del anticuerpo) para así obtener un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención que se una a la IL-1 β .

Las células huésped pueden ser células huésped procarióticas (tales como *E. coli*) o células huésped eucarióticas (tales como una célula de levadura, una célula de insecto o una célula de vertebrado). La célula huésped, al ser cultivada

bajo condiciones apropiadas, expresa un anticuerpo o fragmento que se une a la IL-1 β , que puede posteriormente ser recogido del medio de cultivo (si la célula huésped lo secreta al medio) o directamente de la célula huésped que lo produzca (si el mismo no es secretado). La selección de una célula huésped apropiada dependerá de varios factores tales como los deseados niveles de expresión, las modificaciones polipeptídicas que sean deseables o necesarias para la actividad, tal como la glicosilación o la fosforilación, y la facilidad de plegamiento para formar una molécula biológicamente activa. Las de una serie de adecuadas células huésped son conocidas en la técnica y muchas pueden ser obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), de Manassas, Va. Los ejemplos incluyen a células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino (CHO) (N° CCL61 de la ATCC), células CHO DHFR (Urlaub *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 4216-4220 (1980)), células renales embrionarias humanas (HEK) 293 o 293T (N° CRL1573 de la ATCC), células 3T3 (N° CCL92 de la ATCC) o células PER.C6. Son conocidos en la técnica la selección de adecuadas células huésped de mamífero y los métodos de transformación, cultivo, amplificación, cribaje y producción y purificación de productos. Otras adecuadas líneas celulares de mamífero son las líneas celulares COS-1 (N° CRL1650 de la ATCC) y COS-7 de mono (N° CRL1651 de la ATCC) y la línea celular CV-1 (N° CCL70 de la ATCC). Adicionales ejemplos de células huésped de mamífero incluyen a los miembros del grupo que consta de líneas celulares de primate, líneas celulares aviares y líneas celulares de roedor, incluyendo las líneas celulares transformadas. Son también adecuadas células diploides normales, cepas celulares derivadas de cultivo *in vitro* de tejido primario y explantes primarios. Las células candidatas pueden ser genotípicamente deficientes en el gen de selección, o pueden contener un gen de selección de acción dominante. Otras adecuadas líneas celulares de mamífero incluyen, aunque sin carácter limitativo, a los miembros del grupo que consta de células N2A de neuroblastoma de ratón, células L-929 de ratón, HeLa, líneas 3T3 derivadas de ratones suizos, Balb-c o NIH o líneas celulares de hámster HaK o BHK, que pueden ser obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo, de Manassas, Va. Cada una de estas líneas celulares es conocida y está a disposición de los expertos en la técnica de la expresión de proteínas.

Son análogamente útiles como células huésped adecuadas para la presente invención las células bacterianas. Por ejemplo, las distintas cepas de *E. coli* (como p. ej. la HB101 (N° 33694 de la ATCC), la DH5 α , la DH10 y la MC1061 (N° 53338 de la ATCC)) son perfectamente conocidas como células huésped en el campo de la biotecnología. Pueden también emplearse en este método varias cepas de *B. subtilis*, *Pseudomonas* spp., otros *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. y organismos similares.

Para la expresión de las cadenas livianas y pesadas, el (los) vector(es) de expresión que codifica(n) las cadenas pesadas y livianas es (son) transfectados en una célula huésped mediante técnicas estándar. La transfección incluye a las de una amplia variedad de técnicas que se usan comúnmente para la introducción de DNA exógeno en una célula huésped procariótica o eucariótica, como p. ej. la electroporación, la precipitación de fosfato cálcico, la transfección con DEAE-dextrano y técnicas similares. A pesar de que es teóricamente posible expresar los anticuerpos o fragmentos que se unen a la IL-1 β en células huésped procarióticas o eucarióticas, la expresión de los anticuerpos o fragmentos en células eucarióticas, y con la máxima preferencia en células huésped de mamífero, es la más preferida porque tales células eucarióticas, y en particular las células de mamífero, es más probable que ensamblen y secreten un anticuerpo correctamente plegado e inmunológicamente activo en comparación con las células procarióticas. Las células huésped de mamífero para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen a los miembros del grupo que consta de células de Ovario de Hámster Chino (células CHO) (incluyendo a células DHFR-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, usadas con un marcador seleccionable de DHFR, p. ej. como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando vectores de expresión recombinante que codifican genes de anticuerpo son introducidas en células huésped de mamífero, los anticuerpos son producidos cultivando las células huésped por espacio de un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped, o más preferiblemente, la secreción del anticuerpo al medio de cultivo en el cual se cultivan las células huésped. Los anticuerpos pueden ser recuperados a partir del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas estándar.

Muchas cepas de células de levadura que son conocidas en la técnica están también disponibles como células huésped para la expresión de los anticuerpos y fragmentos. Las células de levadura preferidas, incluyen por ejemplo, a las *Saccharomyces cerevisiae*. Adicionalmente, cuando se desee pueden utilizarse sistemas celulares de insectos. Tales sistemas están descritos por ejemplo en Kitts *et al.* (Biotechniques, 14:810-817 (1993)), Lucklow (Curr. Opin. Biotechnol., 4, 564-572 (1993)) y Lucklow *et al.* (J. Virol., 67, 4566-4579 (1993)). Son células de insecto preferidas las Sf-9 y Hi5 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.).

La transformación o transfección de una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento que se une a la IL-1 β en una célula huésped seleccionada puede ser llevada a cabo por métodos perfectamente conocidos entre los que se incluyen los métodos que hacen uso de cloruro cálcico, los métodos de electroporación, los métodos de microinyección, los métodos de lipofección o los métodos que emplean DEAE-dextrano. El método que se seleccione dependerá en parte del tipo de célula huésped a usar. Estos métodos y otros métodos adecuados son perfectamente conocidos y se exponen, por ejemplo, en Sambrook *et al. supra*.

Pueden también usarse animales transgénicos para expresar anticuerpos y fragmentos glicosilados. Por ejemplo, puede usarse un animal transgénico productor de leche (una vaca o una cabra, por ejemplo) y pueden obtenerse agentes de unión glicosilados en la leche animal. Como alternativa, pueden usarse plantas para producir agentes de unión selectiva glicosilados.

Células huésped que comprendan un vector de expresión que codifique un anticuerpo o fragmento que se una a la IL-1 β pueden ser cultivadas usando medios conocidos en la técnica. Los medios habitualmente contendrán todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y la supervivencia de las células. Los ejemplos de medios para cultivar células *E. coli* incluyen el Caldo de Luria (LB) y/o el Caldo Terrific (TB). Son medios adecuados para cultivar células eucarióticas los RPMI 1640, MEM y DMEM, que pueden ser suplementados con suero y/o factores de crecimiento según se desee para la específica línea celular que se cultive. Un ejemplo de medio para cultivos de células de insecto es el medio de Grace suplementado con yeastolato, hidrolizado de lactalbúmina y/o suero bovino fetal, según sea necesario.

Puede ser añadido como suplemento a los medios un antibiótico u otro compuesto que sea útil para el crecimiento selectivo de células transfectadas o transformadas. El compuesto será elegido sobre la base del elemento marcador seleccionable presente en el plásmido con el cual fue transformada la célula huésped. Por ejemplo, cuando el elemento marcador seleccionable es la resistencia a la canamicina, el compuesto que se añadirá al medio de cultivo será canamicina. Otros compuestos para crecimiento selectivo incluyen a la ampicilina, la tetraciclina y la neomicina.

La cantidad de anticuerpo o fragmento que se une a la IL-1 β producido por una célula huésped puede ser evaluada usando métodos conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, sin carácter limitativo, el análisis Western blot, la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, la electroforesis en gel no desnaturizante, la separación por HPLC, la inmunoprecipitación y/o los análisis de actividad.

La purificación de un anticuerpo o fragmento que se une a la IL-1 β y ha sido secretado al medio celular puede llevarse a cabo usando las de una variedad de técnicas entre las que se incluyen la cromatografía de afinidad, de inmunoafinidad o de intercambio iónico, la cromatografía de tamices moleculares, la electroforesis en gel preparativa o concentración isoelectrónica, la cromatografía de concentración y la cromatografía de líquidos de alta presión. Por ejemplo, los anticuerpos que comprenden una región Fc pueden ser purificados por cromatografía de afinidad con Proteína A, que se une selectivamente a la región Fc. Formas modificadas de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno pueden ser preparadas con marcas de afinidad tales como hexahistidina u otro pequeño péptido tal como FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, Conn.) o myc (Invitrogen) en su terminal carboxilo o amino, y pueden ser purificadas mediante una columna de afinidad de un solo paso. Por ejemplo, la polihistidina se une con gran afinidad y especificidad al níquel, y por consiguiente puede usarse una columna de afinidad de níquel (tal como las columnas de níquel Qiagen®) para la purificación de agentes de unión selectiva marcados con polihistidina. (Véase, por ejemplo, Ausubel *et al.* eds., Current Protocols in Molecular Biology, Section 10.11.8, John Wiley & Sons, New York (1993)). En algunos casos puede emplearse más de un paso de purificación.

Los anticuerpos o fragmentos que se unen a la IL-1 β y son expresados en células huésped procarióticas pueden estar presentes en forma soluble ya sea en el espacio periplásmico o bien en el citoplasma o en forma insoluble como parte de cuerpos de inclusión intracelular. Los anticuerpos o fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden ser extraídos de la célula huésped usando cualquier técnica apropiada de las que son conocidas en el ramo. Por ejemplo, las células huésped pueden ser lisadas para liberar el contenido del periplasma/citoplasma mediante prensa de French, homogeneización y/o sonicación seguida por centrifugación.

Las formas solubles de un anticuerpo o fragmento que se une a la IL-1 β y está presente en el citoplasma o es liberado desde el espacio periplásmico pueden ser purificadas adicionalmente usando métodos conocidos en la técnica, como por ejemplo la liberación de fragmentos Fab desde el espacio periplásmico bacteriano mediante técnicas de shock osmótico.

Si se han formado cuerpos de inclusión que comprenden un anticuerpo o fragmento, los mismos pueden a menudo unirse a las membranas celulares interiores y/o exteriores y por consiguiente se encontrarán primariamente en el material pelletizado tras centrifugación. El material pelletizado puede ser luego tratado a pH extremos o con agente caotrópico tal como un detergente, guanidina, derivados de guanidina, urea o derivados de urea en presencia de un agente reductor tal como ditiotretol a pH alcalino o tris-carboxietil-fosfina a pH ácido para liberar, disgregar y solubilizar los cuerpos de inclusión. El anticuerpo o fragmento soluble puede ser luego analizado usando electroforesis en gel, inmunoprecipitación o técnicas similares. Si se desea aislar un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno solubilizado, el aislamiento puede ser llevado a cabo usando métodos estándar tales como los que se exponen a continuación y en Marston *et al.* (Meth. Enz., 182:264-275 (1990)).

En algunos casos, un anticuerpo o fragmento que se une a la IL-1 β puede no ser biológicamente activo tras el aislamiento. Pueden usarse para restablecer la actividad biológica varios métodos para "replegar" o convertir un polipéptido para darle su estructura terciaria y generar enlaces disulfuro. Tales métodos incluyen el de exponer al polipéptido solubilizado a un pH de habitualmente más de 7 y en presencia de una determinada concentración de un caotrope. La selección de caotrope es muy similar a las elecciones que se usan para la solubilización de cuerpos de inclusión, pero habitualmente el caotrope es usado a una concentración más baja y no es necesariamente el mismo como los caotropos que se usan para la solubilización. En la mayoría de los casos la solución de replegamiento/oxidación también contendrá un agente reductor o el agente reductor más su forma oxidada en una proporción específica para generar un determinado potencial de redox que permita que se produzca mezcla de disulfuros en la formación del (de los) puente (s) de cisteína de la proteína. Algunas de las parejas redox que se usan comúnmente incluyen a los miembros del grupo que consta de cisteína/cistamina, glutatona (GSH)/ditiobis GSH, cloruro cúprico, ditiotretol (DTT)/ditiano DTT y 2-mercaptoetanol (BME)/di-tio.b(ME). En muchos casos puede usarse un cosolvente para incrementar el rendimiento

del repliegamiento, y los reactivos comunes que se usan con esta finalidad incluyen a los miembros del grupo que consta de glicerina, polietilenglicol de varios pesos moleculares, arginina y reactivos similares.

Los anticuerpos o fragmentos de la presente invención que se unen a la IL-1 β pueden también ser preparados por métodos de síntesis química (tales como la síntesis de péptidos en fase sólida) usando técnicas conocidas en el ramo tales como las expuestas por Merrifield *et al.* (1963), J. Am. Chem. Soc., 85: 2149, Houghten *et al.* (1985), Proc. Natl Acad. Sci. USA, 82: 5132, y Stewart and Young (1984), Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Cl., Rockford, III. Tales anticuerpos o fragmentos pueden ser sintetizados con o sin una metionina en el terminal amino. Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno sintetizados químicamente pueden ser oxidados usando métodos que se exponen en estas referencias para formar puentes disulfuro. Los anticuerpos y fragmentos así preparados conservarán al menos una actividad biológica asociada a un anticuerpo o fragmento de unión a la IL-1 β nativo o recombinante.

Composiciones Farmacéuticas

Con los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, ácidos nucleicos o vectores de la invención que se unen a la IL-1 β pueden hacerse composiciones, y especialmente composiciones farmacéuticas. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención que se une a la IL-1 β en mezcla con un soporte adecuado, como p. ej. un agente farmacéuticamente aceptable. Típicamente, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, ácidos nucleicos o vectores de la invención que se unen a la IL-1 β son purificados suficientemente para la administración a un animal antes de hacerse con los mismos una composición farmacéutica.

Los agentes farmacéuticamente aceptables destinados a ser usados en las composiciones farmacéuticas incluyen a los miembros del grupo que consta de soportes, excipientes, diluyentes, antioxidantes, conservantes, colorantes, agentes saborizantes y diluyentes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, solventes, cargas, agentes voluminizantes, tampones, vehículos de aporte, agentes de tonicidad, cosolventes, agentes mojantes, agentes complejantes, agentes tamponantes, antimicrobianos y agentes superficiales.

Son ejemplos de soportes apropiados la salina tamponada neutra o la salina mezclada con albúmina sérica. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina; glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o agentes superficiales no iónicos tales como Tween, plurónicos o polietilenglicol (PEG). También a modo de ejemplo, los adecuados agentes acrecentadores de la tonicidad incluyen a los miembros del grupo que consta de halogenuros metálicos (preferiblemente cloruro sódico o potásico), manitol, sorbitol y agentes similares. Los conservantes adecuados incluyen a los miembros del grupo que consta de cloruro de benzalconio, timerosal, fenetilalcohol, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico y sustancias similares. También puede usarse como conservante peróxido de hidrógeno. Los cosolventes adecuados incluyen a los miembros del grupo que consta de glicerina, propilenglicol y PEG. Los agentes complejantes adecuados incluyen a los miembros del grupo que consta de cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina. Los agentes superficiales o agentes mojantes adecuados incluyen a los miembros del grupo que consta de ésteres de sorbitano, polisorbatos tales como polisorbato 80, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal y sustancias similares. Los tampones pueden ser tampones convencionales tales como acetato, borato, citrato, fosfato, bicarbonato o Tris-HCl. El tampón de acetato puede ser aproximadamente de pH 4-5,5, y el tampón de Tris puede ser aproximadamente de pH 7-8,5. Se exponen adicionales agentes farmacéuticos en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª Edición, A. R. Gennaro, redactor en jefe, Pack Publishing Company, 1990.

La composición puede estar en forma líquida o en una forma liofilizada o secada por congelación y puede incluir uno o varios lioprotectores, excipientes, agentes superficiales, aditivos estructurales de alto peso molecular y/o agentes voluminizantes (véanse por ejemplo las Patentes US 6.685.940, 6.566.329 y 6.372.716). En una realización se incluye un lioprotector, que es un azúcar no reductor tal como sucrosa, lactosa o trehalosa. La cantidad de lioprotector que en general se incluye es tal que, tras la reconstitución, la formulación resultante será isotónica, si bien también pueden ser adecuadas formulaciones hipertónicas o ligeramente hipotónicas. Adicionalmente, la cantidad de lioprotector deberá ser suficiente para impedir una inaceptable cantidad de degradación y/o agregación de la proteína tras liofilización. Los ejemplos de las concentraciones de lioprotector para azúcares (como p. ej. sucrosa, lactosa y trehalosa) en la formulación prelioofilizada son de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 400 mM. En otra realización se incluye un agente superficial tal como, por ejemplo, agentes superficiales no iónicos y agentes superficiales iónicos tales como polisorbatos (como p. ej. polisorbato 20 y polisorbato 80); poloxámeros (como p. ej. el poloxámero 188); poli(etilenglicol)feniléteres (como p. ej. Triton); dodecilsulfato sódico (SDS); laurilsulfato sódico; octilglicósido sódico; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sulfobetaína; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sarcosina; linoleil-, miristil- o cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil- o isostearamidopropil-betaína (como p. ej. lauroamidopropil); miristamidopropil-, palmidopropil- o isostearamidopropil-dimetilamina; metilcocoil-aurato sódico o metiloleil-aurato disódico; y la serie MONAQUAT^{MF} (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.), polietilglicol, polipropilglicol y copolímeros de etilenglicol y propilenglicol (como p. ej. Pluronic, PF68, etc.). Los ejemplos de las cantidades de agente superficial que pueden estar presentes en la formulación prelioofilizada son de aproximadamente un 0,001-0,5%. Los aditivos estructurales de alto peso molecular (como p. ej. cargas y aglutinantes) pueden incluir, por ejemplo, a los miembros del grupo que consta

de acacia, albúmina, ácido algínico, fosfato cálcico (dibásico), celulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa microcristalina, dextrano, dextrina, dextratos, sucrosa, tilosa, almidón pregelatinizado, sulfato cálcico, amilosa, glicina, bentonina, maltosa, sorbitol, etilcelulosa, fosfato disódico de hidrógeno, fosfato disódico, piro sulfito disódico, polivinilalcohol, gelatina, glucosa, goma guar, glucosa líquida, azúcar compresible, silicato de aluminio y magnesio, maltodextrina, óxido de polietileno, polimetacrilatos, povidona, alginato sódico, tragacanto, celulosa microcristalina, almidón y ceína. Los ejemplos de las concentraciones de aditivos estructurales de alto peso molecular son de un 0,1% a un 10% en peso. En otras realizaciones puede incluirse un agente voluminizante (como p. ej. manitol o glicina).

Las composiciones pueden ser adecuadas para administración parenteral. Los ejemplos de composiciones son adecuados para inyección o infusión a un animal por cualquier ruta de las que están disponibles para el trabajador especializado, tales como las rutas intraarticular, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial o intralesional. Una formulación parenteral típicamente será una solución acuosa isotónica estéril y exenta de pirógenos, que opcionalmente contendrá conservantes farmacéuticamente aceptables.

Son ejemplos de solventes no acuosos los miembros del grupo que consta de propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los soportes acuosos incluyen a los miembros del grupo que consta de agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo a la salina y a medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen a los miembros del grupo que consta de solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer lactato, o aceites fijados. Los vehículos intravenosos incluyen a los miembros del grupo que consta de fluidos y nutrientes rellenos, electrolitos rellenos tales como los basados en dextrosa de Ringer, y sustancias similares. Pueden también estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y sustancias similares. Véase en general la publicación Remington's Pharmaceutical Science, 16ª Ed., Mack Eds., 1980.

Las composiciones farmacéuticas que aquí se describen pueden hacerse para aporte controlado o sostenido de una manera que proporcione una concentración local del producto (como p. ej. bolo o efecto de depósito) y/o una incrementada estabilidad o vida media en un determinado ambiente local. Las composiciones pueden incluir la formulación de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, ácidos nucleicos o vectores de la invención que se unen a la IL-1 β con preparaciones particuladas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc., así como con agentes tales como una matriz biodegradable, microesferas inyectables, partículas microcapsulares, microcápsulas, perlas de partículas bioerosionables, liposomas y dispositivos de aporte implantables que proporcionen la liberación controlada o sostenida del agente activo, que entonces puede ser aportado en forma de inyección de depósito. Las técnicas para hacer tales medios de aporte sostenido o controlado son conocidas, y han sido desarrollados y usados para la liberación y el aporte controlado de fármacos los de una variedad de polímeros. Tales polímeros son típicamente biodegradables y biocompatibles. Hidrogeles de polímero, incluyendo a los formados por complejación de segmentos de polímeros o polipéptidos enantioméricos, e hidrogeles con propiedades de sensibilidad a la temperatura o al pH pueden ser deseables para proporcionar un efecto de depósito de fármaco debido a las condiciones suaves y acuosas que intervienen en el atrapamiento de agentes proteínicos bioactivos (como p. ej. anticuerpos). Véase, por ejemplo, la descripción de micropartículas poliméricas porosas de liberación controlada para el aporte de composiciones farmacéuticas en la Publicación de Solicitud WO 93/15722 al amparo del PCT.

Los materiales adecuados con esta finalidad incluyen a los miembros del grupo que consta de polilactidas (véase, p. ej., la Patente U.S. 3.773.919), polímeros de poli-(α -ácidos hidroxicarboxílicos), tales como ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (EP 133.988A), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, Biopolymers, 22: 547-556 (1983)), poli(2-hidroxietilmetacrilato) (Langer *et al.*, J. Biomed. Mater. REs., 15: 167-277 (1981) y Langer, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982)), vinilacetato de etileno, o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Otros polímeros biodegradables incluyen a los miembros del grupo que consta de poli(lactonas), poli(acetales), poli(ortoésteres) y poli(ortocarbonatos). Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas, que pueden ser preparados por cualesquiera de varios métodos que son conocidos en la técnica (véase, p. ej., Eppstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688-92 (1985)). El propio soporte o sus productos de degradación deberá(n) ser atóxico(s) en el tejido diana y no deberá(n) agravar adicionalmente el estado. Esto puede determinarse mediante cribaje de rutina en modelos animales del trastorno diana, o bien, si tales modelos no están disponibles, en animales normales.

La microencapsulación de proteínas recombinantes para liberación sostenida ha sido llevada a cabo con éxito con hormona del crecimiento humana (rhGH), interferon-(rhIFN--), interleuquina-2 y MN rpg 120. Johnson *et al.*, Nat. Med., 2:795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Ther., 27:1221-1223 (1993); Hora *et al.*, Bio/Technology, 8:755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Poly(lactide Polyglycolide) Microsphere Systems," en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell and Newman, eds. (Plenum Press: New York, 1995), pp. 439-462; WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; y U.S. Pat. N° 5.654.010. Las formulaciones de liberación sostenida de estas proteínas fueron desarrolladas usando polímero de ácido poli-láctico-glicólico (PLGA) debido a su biocompatibilidad y a su amplia gama de propiedades de biodegradación. Los productos de degradación de los ácidos PLGA, láctico y glicólico pueden ser eliminados rápidamente dentro del cuerpo humano. Además, la degradabilidad de este polímero puede ser dependiente de su composición y peso molecular. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer", in: M. Chasin and R. Langer (Eds.), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: New York, 1990), pp. 1-41. Los adicionales

ejemplos de composiciones de liberación sostenida incluyen, por ejemplo, a la EP 58.481A, la Pat. U.S. N° 3.887.699, la EP 158.277A, la Patente Canadiense N° 1176565, U. Sidman *et al.*, Biopolymers 22,547 [1983], R. Langer *et al.*, Chem. TEch. 12, 98 [1982], Sinha *et al.*, J. Control. Release 90, 261 [2003], Zhu *et al.*, Nat. Biotechnol. 18, 24 [2000], and Dai *et al.*, Colloids Surf B Biointerfaces 41, 117 [2005].

Se contemplan también polímeros bioadhesivos para ser usados en o con composiciones de la presente invención. Los bioadhesivos son materiales sintéticos y que se dan de manera natural que son capaces de adherirse a sustratos biológicos por espacio de prolongados periodos de tiempo. Por ejemplo, el Carbopol y el Policarbofil son ambos derivados reticulados sintéticos de poli(ácido acrílico). Los sistemas de aporte bioadhesivos basados en sustancias que se dan de manera natural incluyen, por ejemplo, al ácido hialurónico, que es también conocido como hialuronano. El ácido hialurónico es un mucopolisacárido que se da de manera natural y consta de residuos de D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina. El ácido hialurónico se encuentra en la matriz tisular extracelular de los vertebrados, e inclusive en tejidos conectivos, así como en el fluido sinovial y en el humor vítreo y acuoso del ojo. Derivados esterificados de ácido hialurónico han sido usados para producir microesferas que están destinadas a ser usadas para el aporte y son biocompatibles y biodegradables (véanse, por ejemplo, Cortivo *et al.*, biomaterials (1991) 12:727-730; la Publicación Europea N° 517.565, la Publicación Internacional N° WO 96/29998; Illum *et al.*, J. Controlled rel. (1994) 29:133-141). Los ejemplos de composiciones de la presente invención con contenido de ácido hialurónico comprenden un polímero de éster de ácido hialurónico en una cantidad de aproximadamente un 0,1% a aproximadamente un 40% (en peso) de un anticuerpo o fragmento para IL-1 β referido al polímero de ácido hialurónico.

Pueden usarse para aportar composiciones de la presente invención matrices poliméricas tanto biodegradables como no biodegradables, y tales matrices poliméricas pueden comprender polímeros naturales o sintéticos. Se prefieren las matrices biodegradables. El periodo de tiempo por espacio del cual se produce la liberación está basado en la selección del polímero. Típicamente la más deseable es una liberación a lo largo de un periodo de entre unas pocas horas y tres a doce meses. Los ejemplos de polímeros sintéticos que pueden ser usados para formar el sistema de aporte biodegradable incluyen a los siguientes: polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, polialquilenglicoles, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, alcoholes polivinílicos, éteres polivinílicos, ésteres polivinílicos, halogenuros polivinílicos, polivinilpirrolidona, poliglicólicos, polisiloxanos, polianhídridos, poliuretanos y copolímeros de los mismos, poli(ácido bórico), poli(ácido valérico), alquilcelulosa, hidroxialquilcelulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitrocelulosas, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, butirato de acetato de celulosa, ftalato de acetato de celulosa, carboxietilcelulosa, triacetato de celulosa, sal sódica sulfato de celulosa, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), poli(acrilato de octadecilo), polietileno, polipropileno, poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno), poli(tereftalato de etileno), poli(alcoholes vinílicos), acetato de polivinilo, cloruro de polivinilo, poliestireno y polivinilpirrolidona. Los ejemplos de polímeros naturales incluyen a los miembros del grupo que consta de alginato y otros polisacáridos incluyendo dextrano y celulosa, colágeno, derivados químicos de los mismos (sustituciones, adiciones de grupos químicos, como por ejemplo alquilo, alquileno, hidroxilaciones, oxidaciones y otras modificaciones de las que son hechas rutinariamente por los expertos en la materia), albúmina y otras proteínas hidrofílicas, ceína y otras prolaminas y proteínas hidrofóbicas, y copolímeros y mezclas de los mismos. En general, estos materiales se degradan ya sea por hidrólisis enzimática o bien por exposición a agua *in vivo*, por erosión superficial o en masa. El polímero opcionalmente está en forma de un hidrogel (véanse, por ejemplo, la WO 04/009664, la WO 05/087201 y Sawhney *et al.*, Macromolecules, 1993, 26, 581-587) que puede absorber hasta aproximadamente un 90% de su peso en agua y está opcionalmente reticulado con iones multivalentes u otros polímeros.

Los sistemas de aporte también incluyen a sistemas no polímeros que son lípidos, incluyendo esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos de grasas neutras tales como mono-, di- y tri-glicéridos; sistemas de liberación en forma de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; recubrimientos de cera; tabletas comprimidas que usan aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados y sistemas similares. Los ejemplos específicos incluyen, aunque sin carácter limitativo, a los siguientes: (a) sistemas erosionales en los cuales el producto está contenido en una forma dentro de una matriz tal como las que se describen en las Pat. U.S. Núms. 4.452.775, 4.675.189 y 5.736.152, y (b) sistemas difusionales en los cuales un producto permea a una velocidad controlada desde un polímero tal como se describe en las Pat. U.S. Núms. 3.854.480, 5.133.974 y 5.407.686. Los liposomas que contienen el producto pueden ser preparados por métodos conocidos tales como, por ejemplo, (DE 3.218.121; Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688-3692 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-4034 (1980); EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949; EP 142.641; solicitud de patente japonesa 83-118008; Pat. U.S. Núms. 4.485.045 y 4.544.545; y EP 102.324).

Como alternativa o adicionalmente, las composiciones pueden ser administradas localmente mediante implantación en la zona afectada de una membrana, una esponja u otro material apropiado en el cual hay sido absorbido o encapsulado un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención que se une a la IL-1 β . Cuando se use un dispositivo de implantación, el dispositivo puede ser implantado en cualquier tejido u órgano adecuado, y el aporte de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención que se une a la IL-1 β puede ser directamente a través del dispositivo mediante bolo o mediante administración continua o mediante catéter usando infusión continua.

Una composición farmacéutica que comprenda un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención que se una a la IL-1 β puede hacerse para inhalación, tal como por ejemplo en forma de un polvo seco. Pueden también hacerse soluciones para inhalación en un propelente licuado para aporte como aerosol. En aun otra formulación, las soluciones pueden ser nebulizadas. Adicionales composiciones farmacéuticas para administración pulmonar incluyen a las descritas, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud WO 94/20069 al amparo del PCT, que da a conocer el aporte pulmonar de proteínas modificadas químicamente. Para aporte pulmonar, el tamaño de partículas deberá ser adecuado para el aporte al pulmón distal. Por ejemplo, el tamaño de partículas puede ser de 1 μ m a 5 μ m; si bien pueden usarse partículas de mayor tamaño, por ejemplo si cada partícula es bastante porosa.

Ciertas formulaciones con contenido de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, ácidos nucleicos o vectores de la invención que se unen a la IL-1 β pueden ser administradas oralmente. Las formulaciones administradas de esta manera pueden hacerse con o sin los soportes que son habitualmente usados para hacer formas posológicas sólidas tales como tabletas y cápsulas. Por ejemplo, una cápsula puede ser diseñada para liberar la parte activa de la formulación en el punto del tracto gastrointestinal en el que es maximizada la biodisponibilidad y es minimizada la degradación presistémica. Pueden incluirse agentes adicionales para facilitar la absorción de un agente de unión selectiva. También pueden emplearse diluyentes, saborizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes de desintegración de tabletas y aglutinantes.

Otra preparación puede comprender una cantidad eficaz de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención que se una a la IL-1 β en mezcla con excipientes atóxicos que sean adecuados para la fabricación de tabletas. Disolviendo las tabletas en agua estéril o en otro vehículo apropiado, pueden prepararse soluciones en forma de dosis unitaria. Los excipientes adecuados incluyen, aunque sin carácter limitativo, a los miembros del grupo que consta de diluyentes inertes, tales como carbonato cálcico, carbonato o bicarbonato sódico, lactosa o fosfato cálcico; o agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o acacia; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Las formulaciones farmacéuticas adecuadas y/o preferidas pueden determinarse en vista de la presente publicación y de los conocimientos generales del campo de la tecnología de la realización de formulaciones, en dependencia de la ruta de administración prevista, del formato de aporte y de la dosificación deseada. Independientemente de la forma de administración, una dosis eficaz puede calcularse según el peso corporal del paciente, el área superficial del cuerpo o el tamaño del órgano. El adicional afinamiento de los cálculos para determinar la dosificación apropiada para el tratamiento con respecto a cada una de las formulaciones que aquí se describen se hace rutinariamente en la técnica y queda dentro del ámbito de las tareas que se llevan a cabo rutinariamente en la técnica. Las dosificaciones apropiadas pueden ser determinadas mediante el uso de los apropiados datos de dosis-respuesta.

Adicionales formulaciones serán obvias a la luz de la presente exposición, incluyendo las formulaciones que comprenden anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, ácidos nucleicos o vectores de la invención que se unen a la IL-1 β en combinación con uno u otros varios agentes terapéuticos. Por ejemplo, en algunas formulaciones se usa un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención que se une a la IL-1 β en combinación con un segundo inhibidor de una ruta de señalización de IL-1. Los segundos inhibidores representativos incluyen, aunque sin carácter limitativo, a los miembros del grupo que consta de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, péptidos, polipéptidos, compuestos, ácidos nucleicos, vectores y composiciones farmacéuticas tales como por ejemplo los que se describen en los documentos US 6899878, US 2003022869, US 200660094663, US 20050186615, US 20030166069, WO/04022718, WO/05084696 y WO/05019259. Por ejemplo, una composición puede comprender un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención que se una a la IL-1 β en combinación con un anticuerpo, fragmento, ácido nucleico o vector que se una a la IL-1 β y codifique tal anticuerpo o fragmento.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender anticuerpos o fragmentos que se unan a la IL-1 β en combinación con otros agentes activos. Tales combinaciones son las útiles para su finalidad perseguida. Los agentes activos que se exponen a continuación lo son a efectos ilustrativos y no pretenden constituir limitaciones. Las combinaciones que son parte de esta invención pueden ser los presentes anticuerpos y fragmentos y al menos un agente adicional seleccionado de entre los que se enumeran a continuación. La combinación puede también incluir más de un agente adicional, como p. ej. dos o tres agentes adicionales, si la combinación es tal que la composición formada pueda desempeñar su función prevista.

Los agentes activos o combinaciones con los presentes anticuerpos o fragmentos incluyen a los miembros del grupo que consta de un fármaco antiinflamatorio no esteroide (NSAID) tal como aspirina, ibuprofeno y otros derivados del ácido propiónico (alminoprofeno, benoxaprofeno, ácido buclórico, carboprofeno, fenbufeno, fenoprofeno, fluprofeno, flurbiprofeno, indoprofeno, cetoprofeno, mioprofeno, naproxeno, oxaprocina, piroprofeno, pranoprofeno, suprofeno, ácido tiaprofénico y tiopaprofeno), derivados de ácido acético (indometacina, acemetacina, alclofenaco, clidanaco, diclofenaco, fenclofenaco, ácido fenclórico, fentiazaco, fuirofenaco, ibufenaco, isoxepaco, oxpinaco, sulindaco, tiopinaco, tolmetina, cidometacina y zomepiraco), derivados de ácido fenámico (ácido flufenámico, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido niflúmico y ácido tolfenámico), derivados de ácido bifenilcarboxílico (diflunisal y flufenisal), oxicams (isoxicam, piroxicam, sudoxicam y tenoxicam), salicilatos (ácido acetilsalicílico, sulfasalacina) y las pirazolonas (apazona, bezpiperilona, feprazona, mofebutazona, oxifenbutazona, fenilbutazona). Otras combinaciones incluyen inhibidores de ciclooxigenasa-2 (COX-2). Otros agentes activos para ser usados en combinación incluyen a esteroides tales como prednisolona, prednisona, metilprednisolona, betametasona, dexametasona o hidrocortisona. Una combinación de este tipo puede ser especialmente ventajosa, puesto que uno o varios efectos secundarios del

esteroide pueden ser reducidos o incluso eliminados graduando la dosis de esteroide requerida al tratar pacientes en combinación con los presentes anticuerpos y fragmentos.

Los adicionales ejemplos de agentes activos para combinaciones con anticuerpos o fragmentos que se unen a la IL-1 β para la artritis reumatoidea incluyen a los miembros del grupo que consta de fármaco(s) antiinflamatorio(s) supresor(es) de citoquina (CSAIDs); anticuerpos para o antagonistas de otras citoquinas o factores de crecimiento humanos, como por ejemplo TNF, LT, IL-1 β IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF o PDGF. Los anticuerpos y fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden ser combinados con anticuerpos para moléculas de superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, o sus ligandos, incluyendo al CD 154 (gp39 o CD40L).

Las preferidas combinaciones de agentes activos pueden interferir en distintos puntos en la cascada autoinmune y subsiguiente cascada inflamatoria; incluyendo los ejemplos preferidos a los miembros del grupo que consta de antagonistas TNF como anticuerpos TNF quiméricos, humanizados o humanos, D2E7, cA2 (Remicade^{MF}), CDP 571, fragmentos de anticuerpo anti-TNF (p. ej. CDP870), y receptores p55 o p75TNF, derivados de los mismos (p75TNFRlgG (Enbrel^{MF}) o p55TNFRlgG (Lenercept), receptor IL-13 soluble (sIL-13), y también inhibidores de enzima de conversión de TNF α (TACE); y análogamente pueden ser eficaces por la misma razón inhibidores de IL-1 (como p. ej. inhibidores de la enzima convertidora de interleuquina-1, tales como Vx740 o IL-1RA, etc.). Otras combinaciones preferidas incluyen Interleuquina 11, anti-P7s y ligando de glicoproteína p-selectina (PSGL). Aun otra combinación es la que se forma con otros agentes clave de la respuesta autoinmune que pueden actuar paralelamente a la función de IL-1 β o en dependencia o en concierto con la misma.

Los agentes activos para la enfermedad de Crohn en los cuales puede combinarse un anticuerpo o una parte de unión al antígeno incluyen a los miembros del grupo que consta de antagonistas TNF, como por ejemplo anticuerpos anti-TNF, D2E7, cA2 (Remicade^{MF}), CDP 571, fragmentos de anticuerpo anti-TNF (como p. ej. CDP870), constructos TNFR-Ig (p75TNFRlgG (Enbrel^{MF}) y p55TNFRlgG (Lenercept)), anti-P7s, ligando glicoproteína p-selectina (PSGL), receptor IL-13 soluble (sIL-13) e inhibidores PDE4. Los anticuerpos o fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden ser combinados con corticosteroides, como por ejemplo budesonida y dexametasona. Los anticuerpos o fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden también ser combinados con agentes tales como sulfasalacina, ácido 5-aminosalicílico y olsalacina, y con agentes que interfieren en la síntesis o acción de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1, como por ejemplo inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 (p. ej. Vx740) e IL-1ra. Los anticuerpos o fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden también ser usados con inhibidores de la señalización de las células T, como por ejemplo inhibidores de tirosina quinasa 6-mercaptopurinas. Los anticuerpos o fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden ser combinados con IL-11.

Otros ejemplos de agentes activos para esclerosis múltiple con los cuales los anticuerpos o fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden ser combinados incluyen a los miembros del grupo que consta de corticosteroides; prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida; ciclosporina; metotrexato; 4-aminopiridina; tizanidina; interferon- β 1a (Avonex; Biogen); interferon- β 1b (Betaseron; Chiron/Berlex); Copolímero 1 (Cop-1; Copaxona; Teve Pharmaceutical Industries, Inc.); oxígeno hiperbárico; inmunoglobulina intravenosa; clabribina; anticuerpos para o antagonistas de otras citoquinas u otros factores de crecimiento humanos, como por ejemplo TNF, LF, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF y PDGF. Los anticuerpos o fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden ser combinados con anticuerpos para moléculas de la superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 o sus ligandos. Los anticuerpos o fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden ser combinados con agentes tales como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetil, leflunomida, NSAIDs, como por ejemplo ibuprofeno, corticosteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren en la señalización de las citoquinas proinflamatorias tales como TNF α o IL-1 (como p. ej. inhibidores de IRAK, NIK, IKK, p38 o quinasa MAP), inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 β (como p. ej. Vx740), anti-P7s, ligando glicoproteína p-selectina (PSGL), inhibidores de TACE, inhibidores de la señalización de células T tales como inhibidores de quinasa, inhibidores de metaloproteinasas, sulfasalacina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, receptores de citoquina solubles y derivados de los mismos (como p. ej. receptores p55 o p75 TNF solubles, sIL-1 RI, sIL-1 RII, sIL-6R, receptor IL-13 soluble (sIL-13)) y citoquinas antiinflamatorias (como p. ej. IL-4, IL-10, IL-13 y TGF β).

Los ejemplos preferidos de agentes activos para esclerosis múltiple en los cuales los anticuerpos o fragmentos que se unen a la IL-1 β pueden ser combinados incluyen a los miembros del grupo que consta de interferón- β , como por ejemplo IFN β 1a e IFN β 1b; copaxona, corticosteroides, inhibidores de IL-1, inhibidores TNF y anticuerpos para ligando CD40 y CD80.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir una cantidad terapéuticamente eficaz o una cantidad profilácticamente eficaz de los presentes anticuerpos o fragmentos que se unen a la IL-1 β . La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que con las dosificaciones y por espacio de los periodos de tiempo necesarios es eficaz para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o de la parte de anticuerpo puede variar según factores tales como el estado de enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo y la capacidad del anticuerpo o de la parte del anticuerpo para provocar la respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una cantidad con la cual los efectos terapéuticamente beneficiosos pesan más que cualesquiera efectos tóxicos o perjudiciales del anticuerpo o de la parte del anticuerpo. La expresión "cantidad

profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad que con las dosificaciones y por espacio de los periodos de tiempo necesarios es eficaz para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, puesto que una dosis profiláctica se usa en los sujetos antes de una fase de enfermedad o en una fase inicial de enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

5

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, ácidos nucleicos o vectores de la invención que se unen a la IL-1 β pueden ser empleados en solitario o en combinación con otros agentes activos, que pueden estar en la misma composición farmacéutica o en una distinta composición farmacéutica. Por ejemplo, tales otros agentes activos pueden comprender (I) un antagonista de IL-1 (como p. ej. IL-1Ra recombinante o una trampa de IL), (II) un antagonista de receptor de interleuquina-1, (III) un receptor de TNF soluble, (IV) un receptor 2 de TNF soluble (como p. ej. etanercept), (IV) inhibidor de TNF (como p. ej. un anticuerpo tal como D2E7), y/o (V) un agente de terapia del cáncer. Así por ejemplo, uno o varios de estos componentes pueden incluirse en la composición de la invención con un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención que se une a la IL-1 β .

15 Puede ser deseable en algunos casos usar una composición farmacéutica que comprenda un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención que se una a la IL-1 β de una manera *ex vivo*. En este caso, células, tejidos u órganos que han sido retirados de un paciente son expuestos a composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención que se une a la IL-1 β , después de lo cual las células, los tejidos y/o los órganos le son posteriormente reimplantados al paciente.

20

En ciertas situaciones, una composición que comprenda un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector que se una a la IL-1 β puede ser aportada implantándoles a los pacientes células que hayan sido manipuladas genéticamente como aquí se describe para expresar y secretar los polipéptidos, agentes de unión selectiva, fragmentos, variantes o derivados. Tales células pueden ser células animales o humanas, y pueden derivarse del propio tejido del paciente o de otra fuente ya sea humana o bien no humana. Opcionalmente, las células pueden ser células inmortalizadas. Sin embargo, a fin de reducir la probabilidad de una respuesta inmunológica, se prefiere que las células sean encapsuladas para evitar la infiltración de los tejidos circundantes. Los materiales de encapsulación son típicamente membranas o encerramientos poliméricos semipermeables biocompatibles que permiten la liberación del (de los) producto(s) proteico(s) pero impiden la destrucción de las células por parte del sistema inmune del paciente o de otros factores perjudiciales de los tejidos circundantes.

30

Son conocidos métodos que se usan para la encapsulación de células en membranas, y la preparación de células encapsuladas y su implantación en pacientes han sido descritas, por ejemplo, en las Patentes U.S. 4.892.538, 5.011.472 y 5.106.627. En la Publicación de Solicitud WO 91/10425 al amparo de PCT se describe un sistema para encapsular células vivientes. Están descritas y son también conocidas para los expertos en la materia técnicas para hacer los de una variedad de otros medios de aporte sostenido o controlado, tales como soportes liposómicos, partículas bioerosionables o perlas. Las células, con o sin encapsulación, pueden ser implantadas en los adecuados tejidos corporales u órganos del paciente.

35

Una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprenda un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención que se una a la IL-1 β dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos tales como la indicación para la cual se use la composición, la ruta de administración y el estado del sujeto. Las composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz para tratar un estado relacionado con las IL-1. Una “cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz” de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención que se une a la IL-1 β es aquella cantidad que puede tratar o prevenir uno o varios síntomas de una enfermedad relacionada con las IL-1 en su sujeto.

45

En consecuencia, puede ser deseable valorar la dosificación del anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención que se une a la IL-1 β y modificar la ruta de administración según se requiera para obtener el efecto terapéutico óptimo. Las gamas de dosificaciones incluyen a la que va desde aproximadamente 0,1 ng/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg o más (en términos de la cantidad de agente activo por unidad de peso corporal del sujeto a quien se le administre el agente activo), en dependencia de los factores que se han mencionado anteriormente. En otras realizaciones, la dosificación va desde aproximadamente 0,1 μ g/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg, desde aproximadamente 1 μ g/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg, desde aproximadamente 5 μ g/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg, desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg, o desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg. Pueden ser apropiadas otras dosificaciones. La composición puede ser administrada como dosis única, o como dos o más dosis (que pueden contener o pueden no contener la misma cantidad de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención que se fije a la IL-1 β) a lo largo del tiempo, o como infusión continua mediante dispositivo de implantación o catéter, por ejemplo.

60

Métodos de Uso

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, ácidos nucleicos, vectores, células y composiciones de la invención (denominados colectivamente “los compuestos y composiciones de la invención”) pueden ser usados con cualquier finalidad. Por ejemplo, los compuestos y composiciones de la invención pueden ser usados para investigar mecanismos relacionados con las IL-1, así como las enfermedades y los estados asociados a mecanismos relacionados con las IL-1. Sin embargo, los compuestos y composiciones de la invención son especialmente útiles para tratar a un sujeto (como p. ej. un mamífero o un humano) que tenga necesidad de tratamiento para un estado relacionado con las

65

IL-1, como p. ej. un trastorno o enfermedad autoinmune o inflamatorio(a). En consecuencia, en el contexto de la invención se describe un método para tratar o prevenir una enfermedad en un mamífero, comprendiendo dicho método el paso de administrarle a un mamífero que tenga necesidad de ello una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención, con lo cual se trata o previene la enfermedad en el mamífero. La expresión “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad de anticuerpo o fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención que es necesaria para establecer un efecto profiláctico o terapéutico. En el sentido que se le da en la presente, el concepto de tratar una enfermedad o un estado está definido como la acción de reducir temporal o permanentemente o eliminar los síntomas o la progresión de una enfermedad o un estado. Análogamente, el concepto de prevenir una enfermedad o un estado significa inhibir, enlentecer o prevenir temporal o permanentemente el inicio de una enfermedad o un estado (o los síntomas de una enfermedad o un estado).

El método que se describe en el contexto de la invención puede ser usado para tratar o prevenir cualquier enfermedad o estado relacionada(o) con las IL-1. Por ejemplo, se contempla el uso de los presentes anticuerpos y fragmentos en la profilaxis y en el tratamiento de estados médicos o enfermedades mediados por IL-1, como p. ej. estados inflamatorios, alergias y estados alérgicos, cánceres, reacciones de hipersensibilidad, enfermedades autoinmunes, infecciones severas y rechazo al trasplante de órganos o tejidos. Los estados relacionados con las IL-1 incluyen a los miembros del grupo que consta de artritis reumatoidea (RA), osteoartritis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa (UC), shock séptico, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), asma, enfermedad de injerto versus huésped, aterosclerosis, leucemia de las células T del adulto, mieloma múltiple, esclerosis múltiple, crisis fulminante y enfermedad de Alzheimer. Los presentes anticuerpos y fragmentos pueden también ser usados para tratar o prevenir el Trastorno Inflamatorio Multisistémico de Inicio Neonatal (NOMID/CINCA), la artritis idiopática juvenil de inicio sistémico, la enfermedad de Stills, el CAPS o el síndrome de Muckle-Wells.

En general, una enfermedad o un estado puede ser considerada(o) como una enfermedad o un estado relacionada(o) con la IL-1 β si la misma o el mismo va asociada(o) a elevados niveles de IL-1 β en tejido o fluidos corporales o si células o tejidos sacados del cuerpo producen elevados niveles de IL-1 β en cultivo.

Por ejemplo, los métodos que se describen en el contexto de la invención pueden ser usados para tratar o prevenir el Trastorno Inflamatorio Multisistémico de Inicio Neonatal (NOMID/CINCA), la artritis idiopática juvenil de inicio sistémico, los Síndromes Periódicos Asociados a CIAS1 (CAPS), la enfermedad de Stills o el síndrome de Muckle-Wells.

Como otro ejemplo, los presentes métodos pueden ser usados para tratar o prevenir la artritis reumatoidea, la osteoartritis, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, el shock séptico, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, el asma, la enfermedad de injerto versus huésped, la aterosclerosis, la leucemia de las células T del adulto, el mieloma múltiple, la esclerosis múltiple, la crisis fulminante o la enfermedad de Alzheimer.

Como aun otro ejemplo, los presentes métodos pueden ser usados para tratar o prevenir la artritis idiopática juvenil de inicio sistémico, la artritis reumatoidea, la osteoartritis, la aterosclerosis o la miastenia gravis.

Otros ejemplos de estados relacionados con la IL-1 β son la pancreatitis aguda; el ALS; la caquexia/anorexia, incluyendo la caquexia inducida por el SIDA; el asma y otras enfermedades pulmonares; la vasculitis autoinmune; los Síndromes Periódicos Asociados a CIAS1 (CAPS); el síndrome de fatiga crónica; las enfermedades asociadas a Clostridium, incluyendo la diarrea asociada a Clostridium; las indicaciones y los estados coronarios, incluyendo el fallo cardíaco congestivo, la reestenosis coronaria, el infarto de miocardio, la disfunción miocárdica (p. ej. relacionada con sepsis) y el injerto de bypass de arteria coronaria; cánceres tales como el mieloma múltiple y las leucemias mielógenas (como p. ej. AML y CML) y otras, así como la metástasis tumoral; la diabetes (como p. ej. la diabetes insulínica); la endometriosis; el Síndrome Autoinflamatorio Familiar por Frío (FCAS); la fiebre mediterránea familiar (FMF); la fiebre; la fibromialgia; la glomerulonefritis; la enfermedad de injerto versus huésped/rechazo de trasplante; el shock hemorrágico; la hiperalgesia; la enfermedad intestinal inflamatoria; los estados inflamatorios de una articulación, incluyendo la artritis psoriática (así como la osteoartritis y la artritis reumatoidea); la enfermedad ocular inflamatoria como la que puede ir asociada a trasplante corneal, por ejemplo; la isquemia, incluyendo la isquemia cerebral (como p. ej. una lesión cerebral como resultado de trauma, epilepsia, hemorragia o crisis fulminante, cada uno de los cuales puede conducir neurodegeneración); la enfermedad de Kawasaki; el deterioro del aprendizaje; las enfermedades pulmonares (como p. ej. el ARDS); las miopatías (como p. ej. el metabolismo de la proteína muscular, especialmente en sepsis); la neurotoxicidad (p. ej. la inducida por HIV); la osteoporosis; el dolor, incluyendo al dolor relacionado con el cáncer; la enfermedad de Parkinson; la enfermedad periodontal; el parto pretérmino; la psoriasis; la lesión de reperusión; los efectos secundarios de la terapia con radiación; la perturbación del sueño; la enfermedad de la articulación mandibular temporal; el síndrome de fiebre periódica asociada al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAPS); la uveítis; o un estado inflamatorio resultante de esguince, distensión, daño de un cartílago, trauma, cirugía ortopédica, infección u otros procesos de enfermedad.

También se contempla el uso de los presentes anticuerpos y fragmentos en el tratamiento de receptores de trasplantes de corazón, pulmón, corazón y pulmón en combinación, hígado, riñón, pancreáticos, de piel o corneales, incluyendo el rechazo de un aloinjerto o el rechazo de un xenoinjerto, o para la prevención de la enfermedad de injerto versus huésped, tal como a continuación de un trasplante de médula ósea, o la arterioesclerosis asociada a un trasplante de órgano.

Se contempla el uso de los presentes anticuerpos y fragmentos en el tratamiento o la prevención de la enfermedad autoinmune o de estados inflamatorios, y en particular de los estados inflamatorios con una etiología que incluye un componente autoinmune tal como artritis (como por ejemplo la artritis reumatoidea, la artritis crónica progrediente y la artritis y las enfermedades reumáticas, incluyendo los estados inflamatorios y las enfermedades reumáticas que suponen pérdida de hueso, el dolor inflamatorio, la hipersensibilidad (incluyendo tanto la hipersensibilidad de las vías aéreas como la hipersensibilidad dérmica) o las alergias. Las enfermedades autoinmunes específicas para las cuales pueden emplearse los presentes anticuerpos y fragmentos incluyen a los trastornos hematológicos autoinmunes (incluyendo p. ej. la anemia hemolítica, la anemia aplásica, la anemia de células rojas puras y la trombocitopenia idiopática), el lupus eritematoso sistémico, la policondritis, el esclerodoma, la granulomatosis de Wegener, la hepatitis activa crónica, la miastenia gravis, la psoriasis, el síndrome de Steven-Johnson, la esprue idiopática, la enfermedad intestinal inflamatoria autoinmune (incluyendo p. ej. la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn y el Síndrome del Intestino Irritable), la enfermedad endocrina de Graves, la sarcoidosis, la esclerosis múltiple, la cirrosis biliar primaria, la diabetes juvenil (la diabetes mellitus tipo I), la uveitis (anterior y posterior), la queratoconjuntivitis sicca y la queratoconjuntivitis vernal, la fibrosis pulmonar intersticial, la artritis psoriática o la glomerulonefritis (con y sin síndrome nefrótico, p. ej. incluyendo el síndrome nefrótico idiopático o la nefropatía de cambio mínimo).

También se contempla el uso de los presentes anticuerpos y fragmentos en el tratamiento, la prevención o el mejoramiento del asma, de la bronquitis, de la neumooniosis, del enfisema pulmonar y de otras enfermedades obstructivas o inflamatorias de las vías aéreas. Los anticuerpos o fragmentos para tratar indeseables reacciones inflamatorias agudas e hiperagudas que son mediadas por IL-1 pueden ser usados para tratar estados que suponen la producción especialmente o la promoción de la liberación de TNF por IL-1, como p. ej. infecciones agudas, como por ejemplo el shock séptico (como p. ej. el shock endotóxico y el síndrome de distrés respiratorio del adulto), la meningitis, la neumonía y las quemaduras severas; y para el tratamiento de la caquexia o síndrome de consunción asociado a liberación mórbida de TNF, consiguiente a infección, cáncer o disfunción orgánica, y especialmente caquexia asociada al SIDA, p. ej. asociada o consiguiente a infección por HIV.

También se contempla el uso de los presentes anticuerpos y fragmentos para tratar enfermedades del metabolismo óseo incluyendo la osteoartritis, la osteoporosis y otras artritis inflamatorias y la pérdida ósea en general, incluyendo la pérdida ósea relacionada con la edad, y en particular la enfermedad periodontal.

También se contempla el uso de los presentes anticuerpos y fragmentos en el tratamiento o la prevención de Síndromes Periódicos Asociados a CIAS1 (CAPS), incluyendo a cada uno de los miembros del grupo que consta del Trastorno Inflamatorio Multisistémico de Inicio Neonatal (NOMID), Síndrome de Muckle-Wells (MWS) y Síndrome Autoinflamatorio Familiar por Frío (FCAS). (Hoffman *et al.* 2001 Naure 29:301-305; Feldmann *et al.* 2002 Am J Hum Genet 71:198-203; Aksentijevich *et al.* 2002 Arthritis Rheum 46:3340-3348). En conjunto, estos estados son conocidos como "CAPS". El CIAS1 codifica una proteína llamada NALP3 que es un componente del "inflammasoma", que es un complejo enzimático subcelular que regula la actividad de caspasa 1. La caspasa 1 es la enzima que corta la proforma inactiva de la citoquina proinflamatoria IL-1 transformándola en su forma biológicamente activa (Agostini *et al.* 2004 *supra*). Las mutaciones en el CIAS1 conducen a una incrementada producción de IL-1.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención es típicamente administrado al mamífero o humano en forma de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención y un soporte farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que son adecuadas para ser usadas en conjunción con el método para tratar o prevenir una enfermedad son como se ha descrito aquí anteriormente.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo, ácido nucleico o vector de la invención puede ser administrado al mamífero en calidad de único agente activo, o en conjunción con uno u otros varios agentes que perturben la señalización de los receptores de IL-1. Un agente que perturbe la señalización de los receptores de IL-1 puede ser cualquier compuesto o composición que inhiba una interacción entre la IL-1 β y el receptor de IL-1. Por ejemplo, los agentes que perturban la señalización de los receptores de IL-1 incluyen a anticuerpos que se unen a la IL-1 β o al receptor de IL-1, IL-1Ra recombinante (p. ej. de Amgen Inc., Thousand Oaks, CA), y péptidos "trampa" de receptor de IL-1 (p. ej. de Regeneron Inc., Tarrytown, NY). Cuando se usen dos o más agentes que perturben la señalización de los receptores de IL-1, los mismos podrán ser administrados juntamente (p. ej. en una única composición farmacéutica), o bien pueden ser administrados por separado (p. ej. en composiciones farmacéuticas independientes).

El anticuerpo, fragmento, ácido nucleico o vector de la invención puede ser administrado a un mamífero en combinación o en conjunción con uno u otros varios agentes activos para tratar o prevenir enfermedades o estados mediados por IL-1 como los expuestos anteriormente.

Usos Diagnósticos

Además de los usos terapéuticos, los presentes anticuerpos y fragmentos pueden ser usados en métodos diagnósticos para detectar IL-1 β (por ejemplo en una muestra biológica tal como suero o plasma), usando un inmunoensayo convencional tal como inmunoanálisis ligados a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica tisular. Un método para detectar IL-1 β en una muestra biológica puede comprender los pasos de poner a la

muestra biológica en contacto con uno o varios de los presentes anticuerpos o fragmentos y detectar ya sea el anticuerpo o fragmento unido a la IL-1 β o el anticuerpo o fragmento no unido, para con ello detectar la IL-1 β en la muestra biológica. El anticuerpo o fragmento puede ser directa o indirectamente etiquetado con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Las adecuadas sustancias detectables incluyen a varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen a los miembros del grupo que consta de peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; y los ejemplos de adecuados complejos de grupos prostéticos incluyen a los miembros del grupo que consta de estreptavidina/biotina y avidina/biotina; y los ejemplos de adecuados materiales fluorescentes incluyen a los miembros del grupo que consta de umbeliferona, fluoresceína, fluoresceína isotiocianato, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; y un ejemplo de un material luminiscente incluye al luminol; y los ejemplos de adecuado material radiactivo incluyen a los miembros del grupo que consta de ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

En lugar de etiquetar el anticuerpo, el análisis de IL-1 β en fluidos biológicos puede efectuarse mediante un inmunoensayo de competición utilizando patrones de IL-1 β etiquetados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-IL-1 β no etiquetado. En este ensayo se combinan la muestra biológica, los patrones de IL-1 β etiquetados y el anticuerpo anti-IL-1 β y se determina la cantidad de patrón de IL-1 β etiquetado unida al anticuerpo no etiquetado. La cantidad de IL-1 β en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón de IL-1 β etiquetado unido al anticuerpo anti-IL-1 β .

Ejemplos

Los ejemplos siguientes ilustran adicionalmente la invención.

En los Ejemplos siguientes se hace referencia a varios anticuerpos entre los que se incluyen los anticuerpos denominados AB1, AB5 y AB7. Como se ha mencionado anteriormente, el AB1 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 4 y una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 9. El AB5 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 8 y una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 9. El AB7 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 15 y una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 11.

Para varias comparaciones en los Ejemplos siguientes, se hace referencia a un anticuerpo denominado AB-control, que es un anticuerpo que está disponible comercialmente y tiene una relativamente alta afinidad para la IL-1 β . El AB-control es un anticuerpo murino del que se cree que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de la ID SEC N°: 40 y una cadena liviana que comprende la secuencia de la ID SEC N°: 41. Estas secuencias murinas están expuestas en la Publicación de Solicitud de Patente U.S. N° 2003/0026806, en las Figuras 6A y 6B.

En varios de los Ejemplos que se dan a continuación se demuestra que el AB5 y el AB7 tienen una afinidad inesperadamente más alta para la IL-1 β humana que el AB-control.

Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra las afinidades de unión de ciertos anticuerpos de los que se describen en el contexto de la invención a la IL-1 β .

Los anticuerpos denominados AB1 y AB5 fueron sometidos a ensayo para determinar sus propiedades de unión a la IL-1 β usando un dispositivo KINEXA^{MF} (de la Sapidyne Instruments Inc., Boise, ID). Se presentan en las Figs. 2 y 3 las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y liviana de los anticuerpos AB1 y AB5. Fue sometido a ensayo a efectos comparativos un anticuerpo que está disponible comercialmente y tiene una relativamente alta afinidad para la IL-1 β (denominado aquí AB-control).

Están resumidos en la Tabla 1, los resultados de los ensayos de unión a la IL-1 β . Los valores K_D representan las constantes de disociación de la unión para los respectivos complejos anticuerpo-IL-1 β . La K_D fue calculada como la relación del “porcentaje de moléculas disociadas” (porcentaje de disociación para el complejo anticuerpo-IL-1 β) al “porcentaje de moléculas asociadas” (porcentaje de asociación para el complejo anticuerpo-IL-1 β). Una K_D más baja es indicativa de una más alta afinidad del anticuerpo.

TABLA 1

Resultados de Unión a la IL-1 β

Anticuerpo	K _D (pM)
AB-control	3,06
AB1	18,63
AB5	0,261

Los resultados de estos experimentos demuestran que el AB1 y el AB5 se unen con alta afinidad a la IL-1 β . Las afinidades de los anticuerpos de la invención para IL-1 β son equiparables a la afinidad de unión del AB-control para la IL-1 β o mejores que la misma.

Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra la inhibición *in vitro* de la IL-1 β usando los anticuerpos que se describen en el contexto de la invención.

Las potencias inhibitorias de los anticuerpos AB1 y AB5 para la IL-1 β (véase el Ejemplo 1) fueron evaluadas usando un bioensayo que mide la liberación de IL-6 estimulada por IL-1 β desde fibroblastos humanos. Como en el Ejemplo 1, se usó como muestra comparativa a AB-control. Los detalles del ensayo están descritos en Dinarello *et al.*, Current Protocols in Immunoblogy, Ch 6.2.1-6.2.7, John Wiley and Sons Inc., Hoboken, NJ, 2000. Dicho brevemente, fibroblastos MRC5 humanos de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) de Manassas, VA (N° CCL-171 de la ATCC) fueron cultivados hasta la confluencia en placas multipocillos. Las células fueron tratadas con dosis titradas de anticuerpo AB5. Las células fueron a continuación puestas en contacto con (I) 100 pg/ml de IL-1 β o (II) 100 pg/ml de IL-1 β y anticuerpo AB1 o AB5 (del Ejemplo 1). Las células de control negativo no fueron estimuladas con IL-1 β . Las cantidades de IL-6 liberada en cada grupo de células tratadas fueron medidas usando un kit IL-6 ELISA de la BD Pharmingen (Franklin Lakes, NJ) según las instrucciones del fabricante. Los resultados de los análisis ELISA están representados en la Fig. 5 y resumidos en la Tabla 2. La IC₅₀ es la concentración de anticuerpo requerida para inhibir el 50% de la IL-6 liberada por la estimulación con IL-1 β .

TABLA 2

Resultados de ELISA

Anticuerpo	IC ₅₀ (pM)
AB-control	0,017
AB1	0,15
AB5	0,014

Estos resultados demuestran la potencia *in vitro* de los anticuerpos para inhibir la IL-1 β . Además se ha demostrado que la inhibición de la liberación de citoquina estimulada por IL-1 β en MRC 5 guarda correlación con la capacidad del agente para inhibir la actividad mediada por IL-1 *in vivo*. Así, estos resultados indican que los anticuerpos tendrán eficacia inhibitoria de la IL-1 β *in vivo*.

Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra la inhibición *in vivo* de IL-1 β usando anticuerpos como los que se describen en el contexto de la invención.

Para confirmar la eficacia *in vivo* del anticuerpo AB5, su capacidad para bloquear la actividad biológica de la IL-1 β humana fue sometida a ensayo en ratones. Los detalles del ensayo se describen en Economides *et al.*, Nature Med., 9: 47-52 (2003). Dicho brevemente, a ratones C57/B16 macho (Jackson Laboratory Bar Harbor, Maine) les fueron inyectadas intraperitonealmente dosis titradas de AB5 (Ejemplo 1), AB-control (Ejemplo 1) o IgG de control (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Veinticuatro horas después de la inyección de los anticuerpos les

fue inyectada a los ratones por vía subcutánea IL-1 β humana recombinante (rhIL-1 β) (de la PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ) a razón de una dosis de 1 μ g/kg. A las dos horas postinyección de rhIL-1 β (tiempo para la respuesta máxima de IL-6) los ratones fueron sacrificados y la sangre fue recogida y procesada para la obtención del suero. Los niveles de IL-6 en suero fueron analizados mediante ELISA (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ) según el protocolo del fabricante. La inhibición porcentual fue calculada a partir de la relación de IL-6 detectada en el suero de los animales experimentales a la IL-6 detectada en el control (multiplicada por 100).

Los resultados se exponen en la Fig. 6. La capacidad para inhibir la actividad *in vivo* de la IL-1 β es evaluada en función de los niveles de IL-6 por estimulación con IL-1 β en suero. Como se ilustra en la Fig. 6, el anticuerpo AB5 fue tan eficaz como, sino más eficaz que el AB-control para inhibir la actividad *in vivo* de la IL-1 β humana. 3 μ g de AB5 fueron en este ensayo tan eficaces como 10 μ g de AB-control.

Así, los resultados indican que los anticuerpos sometidos a ensayo son útiles para la inhibición de la actividad de IL-1 β *in vivo*. Estos resultados también demuestran que una única inyección de AB5 puede bloquear la acción sistémica frente a la estimulación con IL-1 β a lo largo de un prolongado periodo de tiempo.

Ejemplo 4

El ejemplo siguiente ilustra la preparación de un anticuerpo como los que se describen en el contexto de la invención.

Fueron generadas las de una serie de secuencias de anticuerpos manipulados para no presentar inmunogenicidad en los humanos usando la tecnología HUMAN ENGINEERING^{MF} como se describe en Studnicka *et al.*, Protein Engineering, 7: 805-814 (1994) y en las Patentes U.S. 5.766.886, 5.770.196, 5.821.123 y 5.869.619 y en la Publicación de Solicitud WO 93/11794 al amparo del PCT. Las secuencias de anticuerpos manipulados para no presentar inmunogenicidad en los humanos que fueron generadas incluyen las denominadas AB5.1, AB5.2, AB5.3 y AB5.4. Como se muestra en las Figs. 3 y 4, cada una de estas secuencias comprende dos posiciones variables en la región CDR-3H que están indicadas con X₁ y X₂. Así, en ciertos ejemplos de cada uno de estos anticuerpos manipulados para no presentar inmunogenicidad en los humanos, X₁ y X₂ de la región CDR3 corresponden a alanina y arginina, valina y arginina, fenilalanina y arginina, lisina y lisina o asparagina y arginina, respectivamente.

Ejemplo 5

Los anticuerpos denominados ABR5 y AB7 (una secuencia de anticuerpo manipulado para no presentar inmunogenicidad en los humanos) fueron sometidos a ensayo para determinar sus propiedades de unión a la IL-1 β usando un ensayo cinético de exclusión llevado a cabo en un dispositivo KINEXA^{MF} de una manera como la que se describe en el Ejemplo 1. Una adicional descripción acerca de los dispositivos KINEXA^{MF} y su funcionamiento para la caracterización de anticuerpos puede ser obtenida del fabricante y puede encontrarse en la literatura publicada, y por ejemplo en la Patente U.S. N° 6.664.114 (Sapidyne, Inc.) y en Darling *et al.*, "Kinetic Exclusion Assay Technology: Characterization of Molecular Interactions" ASSAY and Drug Development Technologies, 2004, 2, 647-657. El dispositivo KINEXA^{MF} realiza un ensayo cinético de exclusión y ajusta los datos a varias curvas teóricas y así determina la K_D así como otras propiedades tales como los intervalos de confianza del 95% para K_D. El dispositivo KINEXA^{MF} es en general más sensible que otros dispositivos (como p. ej. un dispositivo BiaCore) para el análisis de características de afinidad tales como las constantes de disociación y los porcentajes de moléculas disociadas.

Se presentan en las Figs. 3 y 4A respectivamente las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y liviana del AB5 y del AB7. Están resumidos en la Tabla 3 los resultados de los ensayos de unión a la IL-1 β . Como en el Ejemplo 1, la K_D fue calculada como la relación del "porcentaje de moléculas disociadas" al "porcentaje de moléculas asociadas", y una K_D más baja es indicativa de una más alta afinidad del anticuerpo.

TABLA 3

Anticuerpo	K _D (pM)
AB5	0,24
AB7	0,30

Los resultados de estos experimentos demuestran que el AB5 (en consonancia con los resultados observados en el Ejemplo 1) y el AB7 se unen a la IL-1 β con inesperadamente alta afinidad, lo cual está representado por los inesperadamente bajos valores de sus constantes de disociación.

Las Figs. 7, 8 y 9 muestran las afinidades de unión de los anticuerpos denominados AB1, AB5 y AB7, respectivamente, según determinación efectuada a partir de un experimento representativo para cada uno usando el análisis KINEXA. La Fig. 7 refleja los resultados que se han expuesto en la Tabla 1, mientras que las Figs. 8 y 9 reflejan los resultados que se exponen en la Tabla 3.

Además de los valores que se exponen en la Tabla 3, los resultados de los ensayos KINEXA también indican los intervalos de confianza del 95% bajos y altos (K_D baja y K_D alta). Para AB5, la K_D baja era 0,07 pM, y la K_D alta era 0,72 pM. Para el AB7, la K_D baja era 0,11 pM, y la K_D alta era 0,74 pM.

Fueron hallados similares valores de K_D baja y de K_D alta en el ensayo que se expone en el Ejemplo 1. Para el AB-control, la K_D baja era 1,62 pM, y la K_D alta era 5,23 pM. Para AB1, la K_D baja era 13,38 pM, y la K_D alta era 24,84 pM. Para AB5, la K_D baja era 0,11 pM, y la K_D alta era 0,56 pM.

Los resultados de los ensayos KINEXA indican que los anticuerpos AB5 y AB7 tenían una constante de disociación inesperadamente más baja que la del AB-control.

Ejemplo 6

Este ejemplo ilustra la inhibición *in vitro* de la liberación de IL-6 estimulada por IL-1 β . Fue analizada para varios anticuerpos de la presente invención como se indica a continuación la IC_{50} para inhibir la liberación de IL-6 desde fibroblastos humanos estimulada por IL-1 β .

La potencia inhibitoria de IL-1 β de los anticuerpos AB5 y AB7 fue evaluada de una manera como la que se describe en el Ejemplo 2, usando un bioensayo que mide la liberación de IL-6 desde fibroblastos humanos estimulada por IL-1 β . Las Figs. 10-12 muestran las curvas de unión para ensayos individuales efectuados con varios anticuerpos. La Fig. 10 muestra la inhibición de la liberación de IL-6 desde fibroblastos humanos producida por los anticuerpos denominados AB1, AB2 y AB3, y los resultados de estos tres ensayos individuales indicaron que el AB1 tenía una IC_{50} de 0,029 nM (29 pM), el AB2 tenía una IC_{50} de 0,76 nM (76 pM), y el AB3 tenía una IC_{50} de 0,214 nM (214 pM). La Fig. 11 muestra la inhibición de la liberación de IL-6 desde fibroblastos humanos producida por los anticuerpos denominados AB1 y AB7 en un ensayo adicional. La Fig. 12 muestra la inhibición de la liberación de IL-6 desde fibroblastos humanos producida por los anticuerpos AB5 y AB7, así como por el Kineret[®] que está disponible comercialmente. Los resultados indicaron que el AB5 y el AB7 tenían con respecto a la IL-1 β inhibitoria una potencia considerablemente mejor que la del Kineret[®], sobre la base de las determinaciones de la IC_{50} en los ensayos. El producto llamado Kineret[®] es una proteína hecha por el hombre que es similar a una proteína que se da de manera natural y se llama antagonista del receptor de interleuquina-1 (IL-Ira) y se encuentra en el cuerpo. Las Figs. 10-12 muestran resultados de ensayos individuales para la potencia de los anticuerpos o del Kineret[®] en términos de la inhibición porcentual de la IL-6 sin el anticuerpo, y la Tabla 4 indica la IC_{50} calculada a partir de estos ensayos individuales. La IC_{50} es la concentración de anticuerpo o de Kineret[®] requerida para inhibir el 50% de la IL-6 liberada por estimulación con IL-1 β .

TABLA 4

Anticuerpo	IC_{50} (pM)
AB5	0,0049 (4,9pM)
AB7	0,0044 (4,4pM)
Kineret	0,0454 (45,4pM)

Además de los resultados de los ensayos individuales que se indican en las Tablas 2 y 4 y que se muestran en las Figuras 6, 10, 11 y 12, fueron llevados a cabo otros ensayos individuales para cada uno de los miembros del grupo que consta de AB1, AB7 y AB-control. A partir de los resultados de los ensayos individuales puede calcularse una IC_{50} media. Fue calculada una IC_{50} media para el AB1 de 66,7 pM a partir de los resultados de los ensayos individuales de 35 pM, 30 pM, 150 pM (este valor está también indicado en la Tabla 2) y 52 pM. Fue calculada una IC_{50} media para el AB7 de 5,6 pM a partir de los resultados de los ensayos individuales de 7,3 pM, 4,2 pM, 4,5 pM, 4,4 pM (este valor está también indicado en la Tabla 4), 6,0 pM, 5,0 pM y 7,8 pM. Fue calculada una IC_{50} media para AB-control de 8,9 pM a partir de los resultados de los ensayos individuales de 5,0 pM, 17,0 pM (este valor está también indicado en la Tabla 2) y 4,9 pM.

Estos resultados demuestran la potencia *in vitro* de los anticuerpos AB1, AB5 y AB7 para inhibir la IL- β . Además se ha demostrado que la inhibición de la liberación de citoquina estimulada por IL-1 β en fibroblastos humanos está en correlación con la capacidad del agente inhibidor para inhibir la actividad mediada por IL-1 *in vivo*. Así, estos resultados indican que los anticuerpos de la invención tendrán eficacia inhibitoria de la IL-1 β *in vivo*.

Ejemplo 7

Este ejemplo ilustra la inhibición *in vivo* de IL-1 β usando anticuerpos que se unen a la IL-1 β .

5 La eficacia *in vivo* de los anticuerpos AB5, AB1 y AB7 y su capacidad para bloquear la actividad biológica de la IL-1 β humana fueron sometidas a ensayo en ratones de una manera como la que se describe en el Ejemplo 3. Los resultados de los ensayos efectuados con AB5 y AB1 se exponen en la Fig. 13, y los resultados de los ensayos efectuados con AB5 y AB7 se exponen en la Fig. 14. La capacidad para inhibir la actividad *in vivo* de la IL-1 β fue evaluada en función de los niveles de IL-6 en suero por estimulación con IL-1 β . Como se ilustra en las Figs. 13 y 14, los anticuerpos AB1, AB5 y AB7 fueron eficaces para inhibir la actividad *in vivo* de la IL-1 β humana.

Estos resultados indican que los anticuerpos sometidos a ensayo son útiles para la inhibición de la actividad de IL-1 β *in vivo*.

15 Ejemplo 8

Este Ejemplo ilustra que al menos algunos de los anticuerpos que se unen a la IL-1 β según la presente invención son capaces de experimentar reacción cruzada con IL-1 β de algunos mamíferos distintos de los humanos y no son capaces de experimentar reacción cruzada con IL-1 β de otros mamíferos no humanos. El anticuerpo denominado AB7 (un anticuerpo que se une a la IL-1 β humana con alta afinidad) fue sometido a ensayo para determinar su unión a la IL-1 β de mamíferos no humanos que eran concretamente el macaco rhesus, el mono cynomolgus, el perro, el cobayo y el conejo.

25 Fue obtenida de Charles River Labs. sangre entera heparinizada reciente de macaco rhesus, mono cynomolgus, perro, cobayo y conejo. La sangre entera fue separada por centrifugación por gradiente de densidad Ficoll y fueron aisladas las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC's). Para las PBMC de cada especie fueron incubadas 2,5 x 10⁵ células/ml en medio RPMI con y sin 50 ng/ml de Lipopolisacárido LPS (*E. coli* 055:B5), y los supernatantes fueron recogidos a las 24 horas post-estimulación. El LPS está destinado a estimular la producción de IL-1 β por parte de las PBMC's. 2 ml de cada supernatante fueron incubados por espacio de 3 horas con 2 μ g de AB7, efectuándose a continuación la adición de 50 μ l de lechada de perlas de proteína A-Sefarosa para inmunoprecipitar el complejo AB7/IL-1 β . Fue añadida a RPMI IL-1 β humana (Peprotech) y la misma fue así usada como controles de inmunoprecipitación/Western blot. Tras centrifugación y lavado de las perlas de Proteína A-Sefarosa, todas las muestras fueron cargadas en un gel para SDS-PAGE y cicladas a 120 V por espacio de 1 hora. A continuación de transferencia a membrana Immobilon-P a 22 V durante la noche y bloqueo con leche desnatada al 5%, el AB7 fue incubado a razón de 2 μ g/ml con la membrana por espacio de 2 horas. Un anticuerpo IgG anti-humana de cabra secundaria conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) fue añadido a continuación de pasos de lavado y la detección se hizo con solución de tetrametilbencidina (TMB) monocomponente.

40 Las Figs. 15 y 16 muestran los Western blots obtenidos a base de este procedimiento. En el lado izquierdo del blot que se muestra en la Fig. 15 (carriles 1-3) están los controles en los cuales fueron añadidas a los medios RPMI cantidades variables (5 ng, 10 ng y 20 ng) de IL-1 β humana. Cerca del fondo del blot pueden verse bandas en cada uno de los carriles en una región que corresponde a un peso molecular de aproximadamente 17 kDa. Estas bandas son indicativas de la unión de AB7 a la IL-1 β humana. El carril central (carril 4) es el medio RPMI. En el lado derecho del blot que se muestra en la Fig. 15 (carriles 5-8) aparecen los resultados para las muestras de mono cynomolgus y macaco rhesus. Los carriles 5 y 6 son las muestras de mono cynomolgus sin LPS y con 50 ng de LPS añadidos al medio RPMI, respectivamente. Los carriles 7 y 8 son las muestras de macaco rhesus sin LPS y con 50 ng de LPS añadidos al medio RPMI, respectivamente. Cerca del fondo del Western blot pueden verse bandas en los Carriles 6 y 8 (las muestras a las cuales les fue añadido LPS) en una región que corresponde a un peso molecular de aproximadamente 17 kDa. Estas bandas en los Carriles 6 y 8 son indicativas de reactividad cruzada del AB7 con la IL-1 β de primate, y concretamente con la IL-1 β de mono cynomolgus y macaco rhesus.

La Fig. 16 muestra Western blots para controles y muestras de PBMC's de perro, cobayos y conejos. En el lado izquierdo de los blots que se muestran en la Fig. 16 (carriles 1-4) están los controles en los cuales fueron añadidas a los medios RPMI cantidades variables (5 ng, 10 ng, 50 ng y 200 ng) de IL-1 β humana. Cerca del fondo del blot pueden verse bandas en cada uno de los carriles en una región que corresponde a un peso molecular de aproximadamente 17 kDa. Estas bandas son indicativas de la unión de AB7 a la IL-1 β humana. El carril 5 en la Fig. 15 es el medio RPMI. Los carriles 6-8 son los resultados para las muestras de PBMC's de perro sin LPS y con 50 ng de LPS y 200 ng de LPS, respectivamente. Los carriles 9 y 10 son los resultados para las muestras de PBMC's de cobayo, sin LPS y con 50 ng de PLS, respectivamente. Los carriles 11 y 12 son los resultados para las muestras de PBMC's de conejo sin LPS y con 50 ng, respectivamente. Cerca del fondo del Western blot pueden verse bandas en los Carriles 7, 8 y 12 (las muestras de perro y conejo a las cuales les fue añadido LPS) en una región que corresponde a un peso molecular de aproximadamente 17 kDa. Estas bandas en los Carriles 7, 8 y 12 son indicativas de reactividad cruzada de AB7 con IL-1 β de perro y con IL-1 β de conejo. La ausencia de una banda visible en el Carril 10 (PBMC de cobayo con adición de 50 ng de LPS) indica que el AB7 no experimentaba reacción cruzada con la IL-1 β de cobayo.

Estos resultados indican que el AB7 reacciona cruzadamente con la IL-1 β de varios mamíferos no humanos, y concretamente de macaco rhesus, mono cynomolgus, perro y conejo, pero no reacciona cruzadamente con la IL-1 β de al menos otro mamífero no humano, y concretamente de cobayo.

Ejemplo 9

Este Ejemplo ilustra adicionalmente que al menos algunos anticuerpos según la presente invención que se unen a la IL-1 β reaccionan cruzadamente con IL-1 β de otros mamíferos no humanos. El anticuerpo AB7 fue sometido a ensayo para determinar su unión a la IL-1 β de mamíferos no humanos, y concretamente de ratón y de rata.

IL-1 β de rata, de ratón y humanas recombinantes (Peprotech) fueron cargadas en estado reductor y no reductor en un gel para SDS-PAGE y cicladas a 120 V por espacio de 1 hora. A continuación de transferencia a membrana Immobilon-P a 22 V durante la noche y bloqueo con leche desnatada al 5%, el AB7 fue incubado a razón de 2 μ g/ml con la membrana por espacio de 2 horas. Un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG humana conjugado con HRP fue añadido a continuación de pasos de lavado y la detección se hizo con solución de TMB (TMB = tetrametilbencidina) monocomponente.

La Fig. 17 muestra el Western blot obtenido mediante los procedimientos anteriormente indicados. Los carriles 1 y 2 son para IL-1 β humana no reducida y reducida, respectivamente. Los carriles 3 y 4 son para IL-1 β de ratón no reducida y reducida, respectivamente. Los carriles 5 y 6 son para IL-1 β de rata no reducida y reducida, respectivamente. En el fondo del blot pueden verse bandas en cada uno de los carriles en una región que corresponde a un peso molecular de aproximadamente 17 kDa. Estas bandas son indicativas de la presencia de IL-1 β , la cual es a su vez indicativa de la unión del AB7 a la IL-1 β humana, a la IL-1 β de ratón y a la IL-1 β de rata. Estos resultados indican que el AB7 reacciona cruzadamente con IL-1 β de roedor.

Ejemplo 10

Este Ejemplo ilustra adicionalmente que al menos algunos anticuerpos según la presente invención que se unen a la IL-1 β son inhibidores de IL-1 β de humanos y de al menos algunos mamíferos no humanos. El anticuerpo AB7 fue sometido a ensayo para determinar la inhibición de la proliferación de células D10 estimulada por IL-1 β de humano, de macaco rhesus, de ratón y de rata.

Las células D10.G4.1 (D10) son células colaboradoras T murinas con especificidad para el antígeno conalbumina de la clara de huevo. Esta línea celular fue obtenida del ratón AKR/J (haplotipo H-2^k MHC) y requiere activación del receptor del antígeno e IL-1 para su crecimiento, proliferación y supervivencia. La línea celular D10 es altamente sensible a la IL-1 y puede responder a la IL-1 de varias especies (incluyendo los humanos, el mono, el ratón y la rata), lo cual permite someter a ensayo el potencial neutralizante en reacción cruzada de un anticuerpo o fragmento que se une a la IL-1 β , tal como el AB7. La proliferación de las células D10 no se ve afectada por el LPS ni por citoquinas derivadas de macrófagos tales como la IL-6 y el TNF- α . Como resultado de ello, los ensayos con células D10 pueden ser usados para valorar la actividad de IL-1 específica de fuentes endógenas (es decir, macrófagos activados por LPS).

Células D10 fueron activadas con Concanavalina A (Con A) y un nivel constante de fuente recombinante o nativa de IL-1 en presencia o en ausencia de varias concentraciones de AB7. Las células fueron cultivadas en placas a razón de 2×10^4 /pocillo y estimuladas con 2,5 μ g/ml de Con A y distintas concentraciones de IL-1 β . Las células fueron cultivadas por espacio de 72 horas y la proliferación fue medida añadiendo el colorante de viabilidad redox Alamar Blue durante las al menos 8-14 horas de cultivo y evaluando la O.D.₅₇₀₋₆₀₀.

Para someter a ensayo la potencia y la reactividad cruzada entre las especies de AB7, fue llevado a cabo el bioensayo con células D10 usando las siguientes concentraciones de IL-1 β recombinante o nativa: 10 pg/ml de IL-1 β humana recombinante; 10 pg/ml de IL-1 β de rhesus recombinante; 10 pg/ml de IL-1 β de ratón y 100 pg/ml de IL-1 β de rata. Para el ensayo con células D10 empleando IL-1 β humana endógena fue usada una dilución 1:360 de supernatante de PBMC's humanas activadas con LPS. Distintas concentraciones de AB7 fueron sometidas a ensayo con cada IL-1 β . Las mediciones de la IC₅₀ fueron determinadas usando Graphpad Prism. La media, la desviación característica (SD) y el error característico (SEM) para la IC₅₀ fueron calculados usando Microsoft Excel.

Los resultados del ensayo con células D10 están resumidos en la Tabla 5, que incluye la IC₅₀ media y el SEM (sobre la base de 4 experimentos para IL-1 β humana recombinante y 3 experimentos para la IL-1 β de otras fuentes). El AB7 era altamente potente para neutralizar la IL-1 β humana recombinante y la IL-1 β humana producida de manera endógena (nativa). El AB7 era también altamente potente para neutralizar la IL-1 β de macaco rhesus recombinante. El Ab7 también neutralizaba la IL-1 β de ratón recombinante con una potencia más baja, teniendo una IC₅₀ que era 1000 veces más alta en comparación con la humana. El AB7 no tuvo actividad significativa alguna contra la IL-1 β de rata en este ensayo.

TABLA 5
Resultados de ELISA

	IC ₅₀ (pM)	SEM (pM)
IL-1 β humana recombinante	2,4	$\pm$ 0,52
IL-1 β humana de producción endógena (nativa)	2,6	$\pm$ 0,11
IL-1 β de macaco rhesus recombinante	2,7	$\pm$ 0,73
IL-1 β de ratón recombinante	2618	$\pm$ 60,9

Estos resultados indican que el AB7 es un anticuerpo neutralizante altamente potente contra la IL-1 β humana, con potencia similar contra formas recombinantes y nativas de la citoquina. La actividad contra la IL-1 β del primate no humano macaco rhesus era similar a la actividad contra la IL-1 β humana. Así, al menos algunos anticuerpos y fragmentos de la presente invención incluyen a anticuerpos y fragmentos que tienen prácticamente la misma potencia contra IL-1 β humana y contra IL-1 β de primate y/o tienen prácticamente la misma potencia contra IL-1 β humana recombinante y contra IL-1 β humana endógena. Estos resultados también indican que el AB7 también neutraliza la IL-1 β de ratón.

Ejemplo 11

Este Ejemplo ilustra el mapeo del epítipo de IL-1 β al cual se unen al menos algunos anticuerpos de la presente invención (como por ejemplo el anticuerpo denominado AB7).

Se usó un conjunto de péptidos PepSpot^{MF} (JPT Peptide Technologies, Berlín, Alemania) para identificar los residuos de aminoácidos clave de IL-1 β (epítipo) que intervienen en la unión del AB7. Fueron sintetizados directamente sobre una membrana los de una gama de doce péptidos de aminoácidos que abarcaba toda la secuencia de aminoácidos de la IL-1 β , solapándose cada péptido en 11 aminoácidos con el anterior. La membrana que llevaba los péptidos fue explorada con AB7 a razón de una concentración de 2 μ g/ml por espacio de 2 h a temperatura ambiente. La unión de los anticuerpos AB7 a los péptidos unidos a la membrana fue detectada usando un anticuerpo secundario anti-humano de cabra conjugado con HRP, efectuándose a continuación quimioluminiscencia mejorada (ECL). Las manchas de péptidos correspondientes a los residuos 83-105 de la IL-1 β dieron positivo para la unión al AB7.

Este mapeo indica que el AB7 se une a un epítipo dentro de la secuencia correspondiente a los residuos 83-105 de la proteína IL-1 β madura. La secuencia comprende los aminoácidos ESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIE, y el AB7 es ejemplo de anticuerpos que se unen a un epítipo dentro de esta secuencia. Se prevé que también se fijen a un epítipo contenido en esta secuencia los anticuerpos denominados AB6, AB8, AB9 y otros, tales como anticuerpos que tengan la cadena pesada de la ID SEC N°: 29 y la cadena liviana de la ID SEC N°: 27.

Ejemplo 12

Este ejemplo ilustra la inhibición *in vitro* de IL-1 β usando un anticuerpo de la invención en un ensayo basado en células con IL-8.

Se tomó de donantes sanos sangre periférica heparinizada reciente. 180 μ l de sangre entera fueron cultivados en una placa de 96 pocillos e incubados con varias concentraciones del anticuerpo AB7 y rhIL-1 β 100 pM. Para muestras tratadas con Kineret[®] se combinaron 1.1 Kineret[®] y rhIL-1 β antes de la mezcla con la sangre. Las muestras fueron incubadas por espacio de 6 horas a 37°C con CO₂ al 5%. Las células de sangre entera fueron luego lisadas con 50 μ l de Triton X-100 al 2,5%. La concentración de interleuquina-8 (IL-8) en los lisados clarificados fue analizada mediante ELISA (Quantikine human IL-8 ELISA kit, R&D Systems) según las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de IL-8 en las muestras tratadas con AB7 y con Kineret[®] fueron comparadas con una muestra de control tratada con control anti-KLH. Los resultados están representados en la Fig. 18 y resumidos en la Tabla 6. La IC₅₀ es la concentración de anticuerpo requerida para inhibir un 50% de la IL-8 liberada por estimulación con IL-1 β .

TABLA 6

	IC ₅₀ (pM)
AB7	1,9 pM
Kineret®	53,4 pM

Estos resultados demuestran la potencia *in vitro* del AB7, según medición efectuada mediante la inhibición de la liberación de IL-8 estimulada por IL-1 β . Estos resultados, que ponen en evidencia una mayor potencia en comparación con Kineret®, indican que los anticuerpos de la invención tendrán eficacia inhibitoria de la IL-1 β *in vivo*.

Ejemplo 13

Este ejemplo ilustra que los anticuerpos de la invención tienen una afinidad sorprendentemente alta en comparación con un anticuerpo que tenga una secuencia similar.

El AB5 fue comparado con el AB-control en cuanto a la secuencia y a la afinidad de unión. El AB5 comprende la región variable de cadena pesada que se expone en la ID SEC N°: 8 y la región variable de cadena liviana que se expone en la ID SEC N°: 9. Se cree que el AB-control comprende la región variable de cadena pesada que se expone en la ID SEC N°: 38 y la región variable de cadena liviana que se expone en la ID SEC N°: 39. Esas secuencias se exponen en la Publicación de Solicitud de Patente U.S. N° 2003/0026806, en las Figuras 6A y 6B. El AB5 y el AB-control tienen las mismas regiones determinantes complementarias en sus regiones variables de cadena pesada y liviana. Sus cadenas pesadas se diferencian en tres residuos de aminoácidos en la región de entramado 3, situada en las posiciones 68, 74 y 86 en las ID SEC NÚMS.: 8 y 38. Sus respectivas cadenas livianas se diferencian en un residuo de aminoácido en la región de entramado 3, situada en la posición 72 en las ID SEC NÚMS.: 9 y 39. A pesar de sus similitudes en las secuencias de sus regiones variables de cadena pesada y liviana, que incluyen las mismas CDRs, el AB5 y el AB-control se diferencian significativa e inesperadamente en cuanto a su afinidad de unión. Como se ha dicho en los anteriores Ejemplos 1 y 5, se comprobó que el AB5 tiene una constante de disociación de menos de 0,3 pM (con una K_D baja de 0,11 pM y una K_D alta de 0,56 pM), y se comprobó que el AB-control tiene una constante de disociación de 3 pM (con una K_D baja de 1,62 pM y K_D alta de 5,23 pM). Dadas las similitudes de la secuencia de aminoácidos, es sorprendente que el AB5 tenga una afinidad más alta en un orden de magnitud.

Fue generado AB7 usando tecnología HUMAN ENGINEERING^{MF}, como se describe en el Ejemplo 4. Las regiones variables de cadena liviana y pesada del AB7 incluyen posiciones de riesgo bajo y moderado en las secuencias de las regiones variables de cadena liviana y pesada AB5. El AB7 comprende la región variable de cadena pesada que se expone en la ID SEC N°: 15 y la región variable de cadena liviana que se expone en la ID SEC N°: 11.

El AB7 fue comparado con el AB-control y con el AB5 en cuanto a la secuencia y a la afinidad de unión. El AB7 y el AB-control tienen las mismas regiones determinantes complementarias en sus regiones variables de cadena pesada y liviana. Sus cadenas pesadas se diferencian en dos de las tres posiciones en la región de entramado 3 (posiciones 74 y 86 en las ID SEC NÚMS.: 15 y 38) donde el AB5 se diferenciaba del AB-control; si bien en la posición 68 en la ID SEC N°: 15 el AB7 tiene el mismo aminoácido como el AB-control. En la cadena liviana del AB7, la posición 72 en la ID SEC N°: 12 se diferencia tanto del AB-control como del AB5. El AB7 incluye otras varias diferencias en las regiones variables de cadena liviana y pesada al ser comparado con el AB-control y con el AB5 en virtud del proceso HUMAN ENGINEERING^{MF}. A pesar de la inclusión de cambios en posiciones de riesgo moderado, y particularmente en vista de los cambios en AB7 en comparación con AB5 en la posición 68 en la región variable de cadena pesada y en la posición 72 en la región variable de cadena liviana, el AB7 y el AB5 tienen similares constantes de disociación, y el AB7 se diferencia significativa e inesperadamente del AB-control con respecto a la afinidad de unión. Como se ha dicho en el anterior Ejemplo 5, se comprobó que el AB7 tiene una constante de disociación de 0,3 pM (con una K_D baja de 0,11 pM y una K_D alta de 0,74 pM). Se comprobó que el AB5 tiene una constante de disociación de 0,24 pM (con una K_D baja de 0,07 pM y una K_D alta de 0,72 pM). Dados los cambios hechos en posiciones de riesgo moderado y en vista de las similitudes generales de la secuencia de aminoácidos, particularmente en las CDRs, es sorprendente que el AB7 tenga una afinidad asimilar a la del AB5 y una afinidad más alta que la del AB-control en un orden de magnitud.

Ejemplo 14

Este ejemplo demuestra que al menos un anticuerpo de la presente invención se une a un epítipo de IL-1 β de forma tal que el anticuerpo unido prácticamente no impide que la IL-1 β unida al anticuerpo se una al receptor tipo I de IL-1. En este Ejemplo se emplea un aparato de análisis cinético Biacore® para examinar si la IL-1 β unida a uno de los presentes anticuerpos (AB7) puede aún unirse al receptor tipo I de IL-1.

Para este Ejemplo fue inmovilizado AB7 sobre la superficie de un chip sensor CM-5 en un aparato de medida Biacore como se indica a continuación. Usando HBS-EP (Biacore®, Inc.) como tampón de desplazamiento, la temperatura fue ajustada a 25°C, el caudal fue ajustado a 10 µl/min., y la trayectoria de flujo fue dirigida a la celda de flujo 2 solamente. Fueron mezclados 135 µl de cada una de las soluciones de NHS y de ECD (Biacore®, Inc.), y fueron inmediatamente inyectados en la trayectoria de flujo 70 µl de la solución de NHS/ECD. Luego fueron inyectados 91 µl de una solución de AB7 (~20 µg/ml en tampón de acetato sódico 10 mM (Biacore®, Inc.)), seguidos por 70 µl de Etanolamina 1M (Biacore®, Inc.). Fueron así inmovilizadas aproximadamente 5650 RU (RU = unidades relativas) de AB7. Para preparar una superficie de referencia, la trayectoria de flujo fue cambiada a la celda de flujo 1 solamente. Fueron mezclados 135 µl de cada una de las soluciones de NHS y de ECD (Biacore®, Inc.), y fueron inmediatamente inyectados en la trayectoria de flujo 70 µl de la solución de NHS/ECD, seguidos por 70 µl de Etanolamina 1M (Biacore®, Inc.).

El aparato de medida Biacore® estaba entonces listo para el análisis de si la IL-1β unida a AB7 seguiría uniéndose al receptor tipo I de IL-1. Para este análisis fue usado receptor tipo I de IL-1 soluble (IL-1 sRI), y la unión de IL-1 sRI a un complejo de AB7/IL-1β fue sometida a ensayo como se indica a continuación. IL-1 sRI (Nº de cat 269-1R-100/CF de RnDSystems) e IL-1β (Peprotech, Nº cat 200-01B) fueron diluidos por separado hasta 10 µg/ml en HBS-EP. El caudal fue ajustado a 10 µl/min. La trayectoria de flujo para el aparato de medida Biacore® fue ajustada a las celdas de flujo 1 y 2 y se usó resta de referencia de la celda de flujo 2 de la celda de flujo 1 para determinar un diferencial de respuesta. La Fig. 19 muestra el diferencial de respuesta medido del aparato de medida Biacore® a lo largo del curso del análisis. La Fig. 20 proporciona una ilustración de los pasos usados en el análisis, indicando las adiciones por separado a la celda de flujo de (A) IL-1 sRI, (B) IL-1β y (C) IL-1 sRI, en ese orden.

A los 200 segundos fueron inyectados 20 µl de IL-1 sRI para verificar la ausencia de unión directamente al AB7 inmovilizado (inyección A en las Figs. 19 y 20). Como se muestra en la Fig. 19, el IL-1 sRI no incrementó las unidades de respuesta, lo cual indica que el IL-1 sRI no se unía directamente al AB7 inmovilizado.

A los 600 segundos, aproximadamente 1000 RU de IL-1β estaban unidas al AB7, formando un complejo AB7/IL-1β sobre la superficie del chip (inyección B en las Figs. 19 y 20). El incremento de unidades de respuesta indica que la IL-1β se unió al AB7 inmovilizado. A continuación fueron inyectados 20 µl de IL-1 sRI a los 1200 segundos para verificar la unión de IL-1 sRI al complejo de AB7 e IL-1β. Aproximadamente 1500 RU de IL-1 sRI se unieron al complejo AB7/IL-1β (inyección C en las Figs. 19 y 20). Este incremento de unidades de respuesta indica que la IL-1 sRI se unía al complejo IL-1β/AB7.

Este Ejemplo indica que la IL-1 sRI se une a la IL-1β pero no se une al AB7, y que el AB7 se une a un epítipo de IL-1β de forma tal que el AB7 unido prácticamente no impide que la IL-1β se una a la IL-1 sRI.

El uso de los vocablos “un” (“uno”) y “una” y “el” (“la”) y de referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (y especialmente en el contexto de las reivindicaciones siguientes) deberá interpretarse que cubre tanto el singular como el plural, a no ser que se indique otra cosa o que ello esté en clara contradicción con el contexto. Las expresiones “que comprende(n)”, “que tiene(n)”, “que incluye(n)” y “que contiene(n)” deberán interpretarse como expresiones de significado abierto (es decir, como expresiones que significan “que incluye(n), aunque sin carácter limitativo”), a no ser que se indique otra cosa. Allí donde se use una expresión de significado abierto para describir una característica o un elemento de la invención, se contempla específicamente que puede usarse una expresión de significado cerrado en lugar de la expresión de significado abierto sin por ello salir fuera del alcance de la invención. Las enumeraciones de gamas de valores que aquí se hacen pretenden meramente servir de método abreviado para referirse individualmente a cada valor individual que queda situado dentro de la gama, a no ser que se indique aquí otra cosa, y cada valor individual queda incorporado en la descripción como si fuese aquí enumerado individualmente. Todos los métodos que aquí se describen pueden ejecutarse en cualquier orden adecuado a no ser que aquí se indique otra cosa o que ello esté de otro modo en clara contradicción con el contexto. El uso de cualesquiera y todos los ejemplos o de lenguaje ejemplificativo (como p. ej. “tal como”) que aquí se hace está meramente destinado a mejor ilustrar la invención y no establece limitación alguna del alcance de la invención, a no ser que se reivindique otra cosa. Ninguna de las formas de expresión que se usan en la descripción deberá ser interpretada como una indicación de que cualquier elemento no reivindicado sea esencial para la puesta en práctica de la invención.

Se describen aquí realizaciones preferidas de esta invención, incluyendo el mejor modo conocido para los inventores para realizar la invención. A los expertos en la materia podrán resultarles obvias variaciones de esas realizaciones preferidas tras haber procedido a la lectura de la anterior descripción. Los inventores prevén que los expertos en la materia estarán en condiciones de emplear aquellas variaciones que sean apropiadas, y los inventores prevén que la invención podrá ser puesta en práctica de otras maneras distintas de las que aquí se describen específicamente. En consecuencia, esta invención incluye todas las modificaciones y todos los equivalentes del objeto que se expone en las reivindicaciones adjuntas según lo permitido por la legislación aplicable. Además queda incluida en la invención cualquier combinación de los elementos anteriormente descritos en todas las posibles variaciones de los mismos a no ser que aquí se indique otra cosa o que ello esté claramente en contradicción con el contexto.

Referencias citadas en la descripción

5 *Esta lista de referencias que cita el solicitante se aporta solamente en calidad de información para el lector y no forma parte del documento de patente europea. A pesar de que se ha procedido con gran esmero al compilar las referencias, no puede excluirse la posibilidad de que se hayan producido errores u omisiones, y la OEP se exime de toda responsabilidad a este respecto.*

Documentos de patente citados en la descripción

- | | | |
|----|------------------------------|-----------------------|
| 10 | • US 4474893 A [0060] | • US 6352842 B [0127] |
| | • WO 8601533 A [0063] | • US 6344328 B [0127] |
| | • US PATENTS4816567 A [0064] | • US 6335179 B [0127] |
| 15 | • US 5721367 A [0064] | • US 6280926 B [0127] |
| | • US 5837243 A [0064] | • US 6238884 B [0127] |
| 20 | • US 6180377 B [0064] | • US 6174673 B [0127] |
| | • US PATENTS5766886 A [0066] | • US 6171820 B [0127] |
| | • US 5770196 A [0066] [0249] | • US 6168919 B [0127] |
| 25 | • US 5821123 A [0066] [0249] | • US 6057103 B [0127] |
| | • US 5869619 A [0066] [0249] | • US 6054267 B [0127] |
| 30 | • WO 9311794 A [0066] [0249] | • US 6030779 B [0127] |
| | • US 6998253 B [0078] | • US 6001574 B [0127] |
| | • WO 9632478 A [0079] [0080] | • US 5965408 B [0127] |
| 35 | • WO 9734631 A [0080] | • US 5958672 B [0127] |
| | • EP 404097 A [0101] | • US 5939250 B [0127] |
| 40 | • WO 9311161 A [0101] | • US 5763239 B [0127] |
| | • US 20050136049 A [0108] | • US 6395547 B [0127] |
| | • US 20050037421 A [0108] | • US 6376246 B [0127] |
| 45 | • WO 03041600 A [0114] | • US 6372497 B [0127] |
| | • US 20030133939 A [0114] | • US 6368861 B [0127] |
| 50 | • US 20030118592 A [0114] | • US 6365408 B [0127] |
| | • US 5770380 A [0116] | • US 6365377 B [0127] |
| | • US 20040171116 A [0116] | • US 6358740 B [0127] |
| 55 | • US 20040266993 A [0116] | • US 6358742 B [0127] |
| | • US 20050038229 A [0116] | • US 6355484 B [0127] |
| 60 | • US 6489145 B [0127] | • US 6344356 B [0127] |
| | • US 6773900 B [0127] | • US 6337186 B [0127] |
| | • US 6764835 B [0127] | • US 6335160 B [0127] |
| 65 | • US 6740506 B [0127] | • US 6323030 B [0127] |

ES 2 335 232 T3

	• US 6713282 B [0127]	• US 6319714 B [0127]
	• US 6713281 B [0127]	• US 6319713 B [0127]
5	• US 6713279 B [0127]	• US 6303344 B [0127]
	• US 6709841 B [0127]	• US 6297053 B [0127]
	• US 6696275 B [0127]	• US 6291242 B [0127]
10	• US 6677115 B [0127]	• US 6287861 B [0127]
	• US 6673552 B [0127]	• US 6277638 B [0127]
15	• US 6656677 B [0127]	• US 6180406 B [0127]
	• US 6605449 B [0127]	• US 6165793 B [0127]
	• US 6566050 B [0127]	• US 6132970 B [0127]
20	• US 6562594 B [0127]	• US 6117679 B [0127]
	• US 6555315 B [0127]	• US 5834252 B [0127]
25	• US 6537776 B [0127]	• US 5830721 B [0127]
	• US 6528249 B [0127]	• US 5811238 B [0127]
	• US 6479258 B [0127]	• US 5605793 B [0127]
30	• US 6455254 B [0127]	• WO 9014363 A [0155]
	• US 6440668 B [0127]	• US 4399216 A [0161]
35	• US 6368798 B [0127]	• US 4634665 A [0161]
	• US 6361974 B [0127]	• US 5179017 A [0161]
	• US 6358709 B [0127]	• US 6685940 B [0185]
40	• US 6566329 B [0185]	• EP 36676 A [0193]
	• US 6372716 B [0185]	• EP 88046 A [0193]
45	• WO 9315722 A [0188]	• EP 143949 A [0193]
	• US 3773919 A [0189]	• EP 142641 A [0193]
	• EP 133988 A [0189]	• JP 58118008 A [0193]
50	• WO 9703692 A [0190]	• US 4485045 A [0193]
	• WO 9640072 A [0190]	• US 4544545 A [0193]
55	• WO 9607399 A [0190]	• EP 102324 A [0193]
	• US 5654010 A [0190]	• WO 9420069 A [0195]
	• EP 58481 A [0190]	• US 6899878 B [0199]
60	• US 3887699 A [0190]	• US 2003022869 A [0199]
	• EP 158277 A [0190]	• US 20060094663 A [0199]
65	• CA 1176565 [0190]	• US 20050186615 A [0199]
	• EP 517565 A [0191]	• US 20030166069 A [0199]

ES 2 335 232 T3

- WO 9629998 A [0191]
- WO 04022718 A [0199]
- WO 04009664 A [0192]
- WO 05084696 A [0199]
- 5 • WO 05087201 A [0192]
- WO 05019259 A [0199]
- US 4452775 A [0193]
- US 4892538 A [0211]
- US 4675189 A [0193]
- US 5011472 A [0211]
- 10 • US 5736152 A [0193]
- US 5106627 A [0211]
- US 3854480 A [0193]
- WO 9110425 A [0211]
- 15 • US 5133974 A [0193]
- US 20030026806 A [0235] [0285]
- US 5407686 A [0193]
- US 5766886 A [0249]
- DE 3218121 [0193]
- US 6664114 B [0250]
- 20 • EP 52322 A [0193]

Literatura no de patentes que se cita en la descripción

- 25 • Antibodies A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, 1988 [0043]
- *Antibody Engineering*. 2001 [0054]
- **Dinarello et al.** Current Protocols in Immunology. *John Wiley and Sons Inc*, 2000 [0054]
- 30 • *Antibody Engineering*, The practical approach series. University Press, 1996 [0055]
- **Lewis et al.** *Mol. Immunol.*, 1995, vol. 32, 1065-72 [0057]
- 35 • **Marks et al.** *Biotechnology*, 1992, vol. 10, 779-83 [0058]
- **Kranz et al.** *Proc. NatL Acad. Sci. USA*, 1981, vol. 78, 5807 [0060]
- **Morrison et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6841-6855 [0063]
- 40 • **Boulianne et al.** *Nature*, 1984, vol. 312, 643-646 [0063]
- **Morrison et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 81, 6851 [0063]
- 45 • **Marks et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581 [0072]
- **Angal et al.** *Mol Immunol.*, 1993, vol. 30, 105-8 [0081]
- **Wahl et al.** *J. Nucl. Med.*, 1983, vol. 24, 316-25 [0088]
- 50 • **Evans et al.** *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 11477-11483 [0090]
- **Vigers et al.** *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, 36927-36933 [0090]
- 55 • **Yanofsky et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 7381-7386 [0090]
- **Fredericks et al.** *Protein Eng. Des. Sel.*, 2004, vol. 17, 95-106 [0090]
- **Slack et al.** *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 2513-2524 [0090]
- 60 • **Smith et al.** *Immunity*, 2003, vol. 18, 87-96 [0090]
- **Vigers et al.** *Nature*, 1997, vol. 386, 190-194 [0090]
- 65 • **Ruggiero et al.** *J. Immunol.*, vol. 158, 3881-3887 [0090]
- **Neuberger et al.** *Nature*, 1984, vol. 312, 604 [0063]

ES 2 335 232 T3

- **Jones et al.** *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0064]
- **Riechmann et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0064]
- 5 • **Verhoeyen et al.** *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0064]
- **Studnicka et al.** *Protein Engineering*, 1994, vol. 7, 805-814 [0066] [0249]
- 10 • **Hoogenboom et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0072]
- **Kipriyanov, S. M. et al.** *Mol. Immunol.*, 1994, vol. 31, 1047-1058 [0100]
- **Holliger et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0101]
- 15 • **Poljak et al.** *Structure*, 1994, vol. 2, 1121-1123 [0101]
- **Bird et al.** *Science*, 1988, vol. 242, 423-426 [0102]
- **Huston et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 85, 5879-5883[0102]
- 20 • **Hamers-Casterman et al.** *Nature*, 1993, vol. 363, 446 [0104]
- **Nguyen et al.** *J. Mol. Biol.*, 1998, vol. 275, 413 [0104]
- 25 • **Nuttall et al.** *Mol Immunol.*, 2001, vol. 38, 313-26 [0104]
- **Greenberg et al.** *Nature*, 1995, vol. 374, 168-73 [0104]
- **Roux et al.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, 11804 [0104]
- 30 • **Nguyen et al.** Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation. *Immunogenetics*, 2002, vol. 54 (1), 39-47 [0104]
- **Hamers-Casterman et al.** *Nature*, 1993, vol. 363, 446-448 [0104]
- 35 • **Muyldermans et al.** *J. Mol. Recognit.*, 1999, vol. 12, 131-140 [0104]
- **Cortez-Retamozo et al.** *Cancer Research*, 2004, vol. 64, 2853-57 [0104]
- 40 • **Conrath et al.** *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, vol. 45, 2807-12 [0104]
- **Nguyen et al.** *Mol. Immunol.*, 1999, vol. 36, 515-524 [0105]
- 45 • **Woolven et al.** *Immunogenetics*, 1999, vol. 50, 98-101 [0105]
- **Nguyen et al.** *Adv. Immunol*, 2001, vol. 79, 261-296 [0106]
- **Nguyen et al.** *Immunogenetics*, 2002, vol. 54, 39-47 [0106]
- 50 • **Irving et al.** *J. Immunol. Methods*, 2001, vol. 248, 31-45 [0106] [0109]
- **Roux et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, 11804 [0106]
- 55 • **Desmyter et al.** *J Biol. Chem*, 2001, vol. 276, 26285-90 [0107]
- **Reichman et al.** *J Immunol Methods*, 1999, vol. 231, 25-38 [0107]
- **Muyldermans.** *Biotechnol*, 2001, vol. 74, 277-302 [0108]
- 60 • **Ghahroudi et al.** *FEBS Lett.*, 1997, vol. 414, 521-526 [0108]
- van der **Linden et al.** *J. Biotechnol.*, 2000, vol. 80, 261-270 [0108]
- **Guo et al.** *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 27562-27568 [0090]
- 65 • **Svenson et al.** *Eur. J. Immunol.*, 1995, vol. 25, 2842-2850 [0090]
- **Arend et al.** *J. Immunol.*, 1994, vol. 153, 4766-4774 [0090]

ES 2 335 232 T3

- **Ward** *et al.* *Nature*, 1989, vol. 341, 544-546 [0099] [0101]
- **Kipriyanov**, S. M. *et al.* *Human Antibodies and Hybridomas*, 1995, vol. 6, 93-101 [0100]
- 5 • **Riechmann** *et al.* *Immunol. Methods*, 1999, vol. 231, 25-38 [0110]
- **Schoonjans** *et al.* *J Immunol*, 2000, vol. 165, 7050-57 [0112]
- **Willems** *et al.* *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 2003, vol. 786, 161-76 [0112]
- 10 • **Olafsen** *et al.* *Protein Eng Des Set.*, 2004, vol. 17(4), 315-23 [0112]
- **Biocca** *et al.* *EMBO J*, 1990, vol. 9, 101-108 [0113]
- 15 • **Colby** *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, vol. 101, 17616-21 [0113]
- **Mhashikar** *et al.* *EMBO J*, 1995, vol. 14, 1542-51 [0113]
- **Wheeler** *et al.* *FASEB J*, 2003, vol. 17, 1733-5 [0113]
- 20 • **Heng** *et al.* *Med Hypotheses.*, 2005, vol. 64, 1105-8 [0113]
- **Tramontano** *et al.* *J. Mol. Recognit.*, 1994, vol. 7, 9 [0116]
- 25 • **McConnell; Hoess.** *J. Mol. Biol.*, 1995, vol. 250, 460 [0116]
- **Nord** *et al.* *Nat. Biotechnol.*, 1997, vol. 15, 772 [0116]
- **Nord** *et al.* *Protein Eng*, 1995, vol. 8, 601 [0116]
- 30 • **Ku; Schultz.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, 6552 [0116]
- **Markland** *et al.* *Biochemistry*, 1996, vol. 35, 8045 [0116]
- 35 • **Markland** *et al.* *Biochemistry*, 1996, vol. 35, 8058 [0116]
- **Rottgen; Collins.** *Gene*, 1995, vol. 164, 243 [0116]
- **Wang** *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 12250 [0116]
- 40 • **Sambrook** *et al.* *Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press*, 2001 [0133]
- **Ausubel** *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons*, 1994 [0133]
- 45 • **Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications (Methods in Molecular Biology).** *Humana Press*, 2004 [0133]
- **McLean** *et al.* *Mol. Immunol.*, 2000, vol. 37, 837-45 [0137]
- 50 • **Walls** *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1993, vol. 21, 2921-9 [0137]
- **Norderhaug** *et al.* *J. Immunol. Meth.*, 1997, vol. 204, 77-87 [0137]
- 55 • **Meth. Enz. Academic Press**, vol. 185 [0138]
- **Bemoist; Chambon.** *Nature*, 1981, vol. 290, 304-310 [0152]
- **Yamamoto** *et al.* *Cell*, 1980, vol. 22, 787-97 [0152]
- 60 • **Wagner** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1981, vol. 78, 1444-5 [0152]
- **Davies** *et al.* *FEBS Lett.*, 1994, vol. 339, 285-290 [0110]
- 65 • **Davies** *et al.* *Protein Eng.*, 1996, vol. 9, 531-537 [0110]
- **Tanha** *et al.* *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 24774-24780 [0110]

ES 2 335 232 T3

- **Omitz et al.** *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol.*, 1986, vol. 50, 399-409 [0152]
- **MacDonald.** *Hepatology*, 1987, vol. 7, 425-515 [0152]
- 5 • **Hanahan.** *Nature*, 1985, vol. 315, 115-22 [0152]
- **Grosschedl et al.** *Cell*, 1984, vol. 38, 647-58 [0152]
- **Adames et al.** *Nature*, 1985, vol. 318, 533-8 [0152]
- 10 • **Alexander et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1987, vol. 7, 1436-44 [0152]
- **Leder et al.** *Cell*, 1986, vol. 45, 485-95 [0152]
- 15 • **Pinkert et al.** *Genes and Devel.*, 1987, vol. 1, 268-76 [0152]
- **Krumlauf et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1985, vol. 5, 1639-48 [0152]
- **Hammer et al.** *Science*, 1987, vol. 235, 53-8 [0152]
- 20 • **Kelsey et al.** *Genes and Devel.*, 1987, vol. 1, 161-71 [0152]
- **Mogram et al.** *Nature*, 1985, vol. 315, 338-340 [0152]
- 25 • **Kollias et al.** *Cell*, 1986, vol. 46, 89-94 [0152]
- **Readhead et al.** *Cell*, 1987, vol. 48, 703-12 [0152]
- **Sani.** *Nature*, 1985, vol. 314, 283-6 [0152]
- 30 • **Mason et al.** *Science*, 1986, vol. 234, 1372-8 [0152]
- **Sambrook et al.** *supra* [0162]
- 35 • **Davis et al.** *Basic Methods in Molecular Biology*, 1995 [0162]
- **Neumann et al.** *EMBO J*, 1982, vol. 1, 841 [0162]
- 40 • Transgenic Mouse: Methods and Portocols. **Hofker et al.** *Methods in Molecular Biology. Humana Press*, 2002 [0165]
- **Urlaub et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 97, 4216-4220 [0166]
- **Urlaub; Chasin.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216-4220 [0168]
- 45 • **R. J. Kaufman; P. A. Sharp.** *Mol. Biol.*, 1982, vol. 159, 601-621 [0168]
- **Kitts et al.** *Biotechniques*, 1993, vol. 14, 810-817 [0169]
- 50 • **Lucklow.** *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1993, vol. 4, 564-572 [0169]
- **Lucklow et al.** *J. Virol.*, 1993, vol. 67, 4566-4579 [0169]
- Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons*, 1993 [0175]
- 55 • **Marston et al.** *Meth. Enz.*, 1990, vol. 182, 264-275 [0178]
- **Merrifield et al.** *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, vol. 85, 2149 [0180]
- 60 • **Houghten et al.** *Proc Natl Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 5132 [0180]
- **Stewart; Young.** *Solid Phase Peptide Synthesis. Pierce Chemical Co*, 1984 [0180]
- **Sidman et al.** *Biopolymers*, 1983, vol. 22, 547-556 [0189]
- 65 • **Brinster et al.** *Nature*, 1982, vol. 296, 39-42 [0152]
- **Villa-Kamaroff et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1978, vol. 75, 3727-3731 [0152]

ES 2 335 232 T3

- **DeBoer et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1983, vol. 80, 21-5 [0152]
- **Swift et al.** *Cell*, 1984, vol. 38, 639-46 [0152]
- 5 • **Langer et al.** *J. Biomed. Mater. Res.*, 1981, vol. 15, 167-277 [0189]
- **Langer.** *Chem. Tech.*, 1982, vol. 12, 98-105 [0189]
- **Eppstein et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 3688-92 [0189]
- 10 • **Johnson et al.** *Nat. Med.*, 1996, vol. 2, 795-799 [0190]
- **Yasuda.** *Biomed. Ther.*, 1993, vol. 27, 1221-1223 [0190]
- 15 • **Hora et al.** *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 755-758 [0190]
- Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems. **Cleland.** *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach. Plenum Press*, 1995, 439-462 [0190]
- 20 • Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer. **Lewis.** *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems. Marcel Dekker*, 1990, 1-41 [0190]
- **U. Sidman et al.** *Biopolymers*, 1983, vol. 22, 547 [0190]
- 25 • **R. Langer et al.** *Chem. Tech.*, 1982, vol. 12, 98 [0190]
- **Sinha et al.** *J. Control. Release*, 2003, vol. 90, 261 [0190]
- **Zhu et al.** *Nat Biotechnol.*, 2000, vol. 18, 24 [0190]
- 30 • **Dai et al.** *Colloids Sur B Biointerfaces*, 2005, vol. 41, 117 [0190]
- **Cortivo et al.** *Biomaterials*, 1991, vol. 12, 727-730 [0191]
- 35 • **Illum et al.** *J. Controlled Rel.*, 1994, vol. 29, 133-141 [0191]
- **Sawhney et al.** *Macromolecules*, 1993, vol. 26, 581-587 [0192]
- **Epstein et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 3688-3692 [0193]
- 40 • **Hwang et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4030-4034 [0193]
- **Hoffman et al.** *Nature*, 2001, vol. 29, 301-305 [0226]
- 45 • **Feldmann et al.** *Am J Hum Genet*, 2002, vol. 71, 198-203 [0226]
- **Aksentijevich et al.** *Arthritis Rheum*, 2002, vol. 46, 3340-3348 [0226]
- **Dinarelli et al.** *Current Protocols in Immunology. John Wiley and Sons*, 2000 [0242]
- 50 • **Economides et al.** *Nature Med.*, 2003, vol. 9, 47-52 [0245]
- **Darling et al.** *Kinetic Exclusion Assay Technology: Characterization of Molecular Interactions. ASSAY and Drug Development Technologies*, 2004, vol. 2, 647-657 [0250]

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo que se une a la IL-1 β o fragmento del mismo que se une a la IL-1 β y comprende una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 11 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 15.
2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una cadena liviana lambda.
- 10 3. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una región de IgG2.
4. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un Fab, un F(ab')₂, un Fv o un fragmento de anticuerpo de cadena única, o una variante o un derivado de cualquiera de estos anticuerpos o fragmentos.
- 15 5. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, un minicuerpo, un anticuerpo lineal, un anticuerpo recombinante quelante, un tricuerpo, un bicuerpo, un intracuerpo, un nanocuerpo, un pequeño producto inmunofarmacéutico modular (SMIP), una proteína de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión, un anticuerpo camelizado, un anticuerpo con contenido de V_{HH} o una variante o un derivado de cualquiera de estos anticuerpos o fragmentos.
- 20 6. Ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
7. Ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo, donde la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 15.
- 30 8. Ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena liviana de un anticuerpo, donde la región variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N°: 11.
- 35 9. Vector que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 6-8.
10. Célula que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 6-8 o el vector de la reivindicación 9, donde dicha célula es una célula troncal embrionaria no humana o un óvulo fertilizado humano.
- 40 11. La célula de la reivindicación 10, donde la célula es una célula troncal embrionaria no humana o un óvulo fertilizado no humano.
12. Animal transgénico que comprende la célula de la reivindicación 10 u 11, no siendo dicho animal un animal humano.
- 45 13. Hibridoma que produce el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
14. Composición que comprende (a) el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 6-8 o el vector de la reivindicación 9, y (b) un soporte adecuado.
- 50 15. La composición de la reivindicación 14, donde el soporte es un soporte farmacéuticamente aceptable.
16. La composición de la reivindicación 15, donde la composición está en una forma adecuada para administración intraarticular, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intralesional, oral o por inhalación.
- 55 17. La composición de la reivindicación 15, donde la composición comprende un lioprotector, un agente superficial, una carga, un aglutinante y/o un agente voluminizante.
- 60 18. La composición de la reivindicación 15, donde la composición es una composición farmacéutica de liberación controlada o de liberación sostenida.

CADENA LIVIANA

DIQMTQX1TSSLSASX2GDRVTIX1CRASQDISNYLSWYQQKPX3X4X5VKLLIYYTSLKLSHSGVPSRFSGSGGTDYX1LTISNLEQEDIATYFC
LOGKMLPWIFGGGKLEIK (ID SEC N°: 1)
CDR1
CDR2
CDR3

X1 es T o S; X2 es L o V; X3 es D o G; X4 es G o K; X5 es T o A;

CADENA PESADA

QVX10LX11ESGPGX12X13KPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIMWWDGDESYNPSLKX14X15LTISKDTSX16NQVX17LKI
TSVX18X19X20DTAX21YFCARX22X23YDPPWFVDWGQGLTVTVSS (ID SEC N°: 2)
CDR1
CDR2
CDR3

X10 es T o Q; X11 es K o Q; X12 es I o L; X13 es L o V; X14 es T o S; X15 es Q o R; X16 es R o K; X17 es F o S; X18 es D o T; X19 es T o A; X20 es V o A; X21 es T o V; X22 es A, V, F, K, o N; X23 es R o K

CADENA PESADA CDR3

X22X23YDPPWFVD (ID SEC N°: 3)

X22 es A, V, F, K, o N; X23 es R o K

Fig. 1

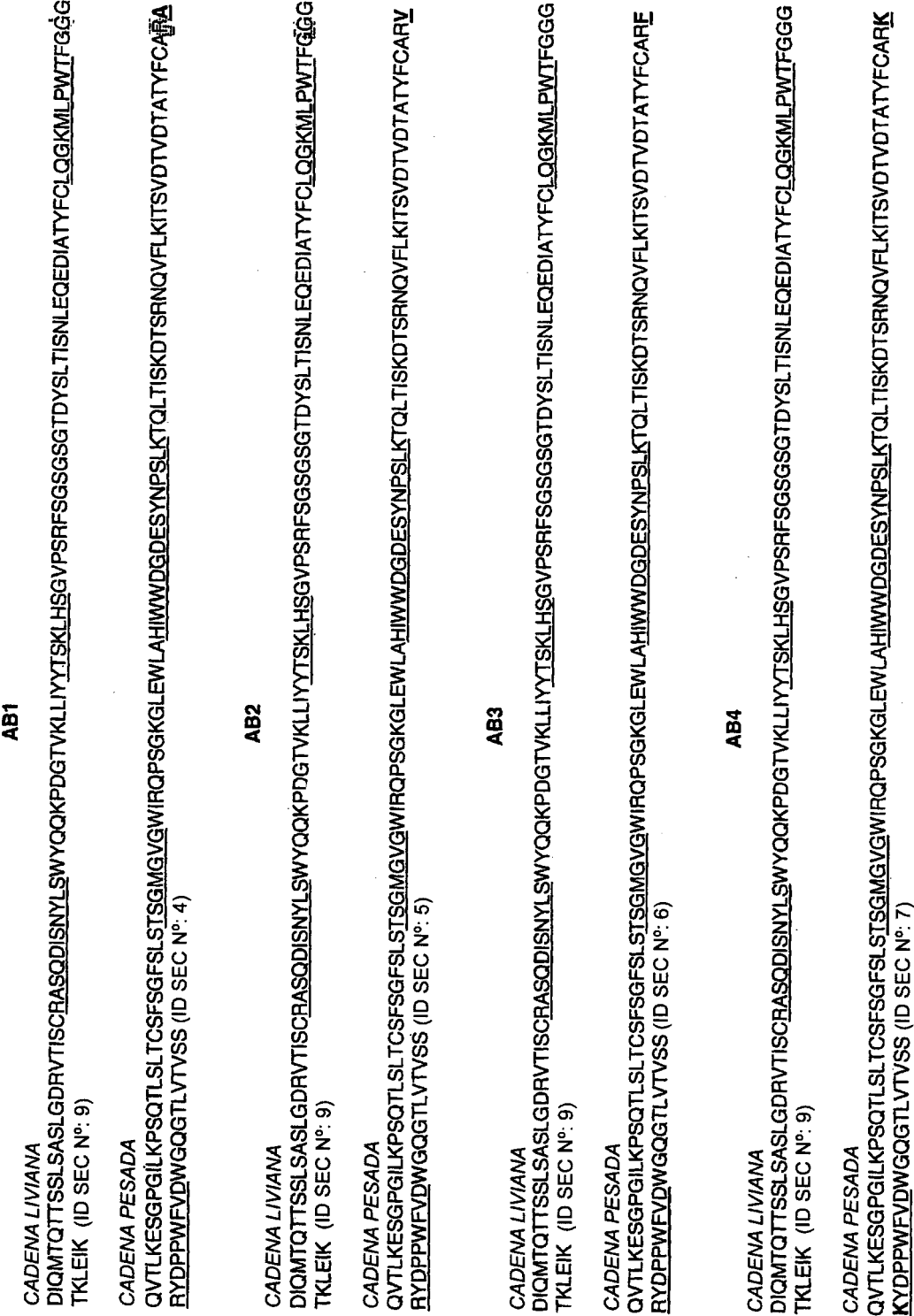


Fig. 2

AB5

CADENA LIVIANA
 DIQMTQTSSLSASLGDRVTITCRASQDISNYLSWYQQKPDGTVKLLIYYTSLHSGVPSRFSGGSGGTDYSLTISNLEQEDATYFCQGGKMLPWTF
 GGGTKLEIK (ID SEC N°: 9)

CADENA PESADA
 QVTLKESGPGILKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIIWWDGDESYNPSLKTQLTISKDTSRNQVFLKITSVDTVDTATYFC
 ARNRYDPPWFVDWGQGTLVTVSS (ID SEC N°: 8)

AB5.1

CADENA LIVIANA
 DIQMTQSTSSLSASLGDRVTITCRASQDISNYLSWYQQKPGKTVKLLIYYTSLHSGVPSRFSGGSGGTDYTLTISSLQQEDFATYFCQGGKMLPWTF
 GGGTKLEIK (ID SEC N°: 10)

CADENA PESADA
 QVQLQESGPGLLKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIIWWDGDESYNPSLKSQLTISKDTSKNQVSLKITSVTAADTATYF
 CARX1X2YDPPWFVDWGQGTLVTVSS (ID SEC N°: 12)

X1 es A, V, F, K, o N; X2 es R o K;

AB5.2

CADENA LIVIANA
 DIQMTQSTSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLSWYQQKPGKAVKLLIYYTSLHSGVPSRFSGGSGGTDYTLTISSLQQEDFATYFCQGGKMLPWT
 FGQGTLEIK (ID SEC N°: 11)

CADENA PESADA
 QVQLQESGPGLLKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIIWWDGDESYNPSLKSRLTISKDTSKNQVSLKITSVTAADTAVYF
 CARX1X2YDPPWFVDWGQGTLVTVSS (ID SEC N°: 13)

X1 es A, V, F, K, o N; X2 es R o K

Fig. 3

AB5.3

CADENA LIVIANA
DIQMTQSTSSLSASLGDRVTITCRASQDISNYLSWYQQKPGKTVKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSGGTDYTLTISSLQQEDFATYFCLQGKMLPWTF
QGTKLEIK (ID SEC N°: 10)

CADENA PESADA
QVQLQESGPGLLKPSQTLSTCSFGFSLSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDESYNPSLKSQLTISKNTSKNQVSLKITSVTAADTATYFC
ARX1X2YDPPWFVDWGQGTLVTVSS (ID SEC N°: 23)

X1 es A, V, F, K, o N; X2 es R o K;

AB5.4

CADENA LIVIANA
DIQMTQSTSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLSWYQQKPGKAVKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSGGTDYTLTISSLQQEDFATYFCLQGKMLPWTF
GGTKLEIK (ID SEC N°: 11)

CADENA PESADA
QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSFGFSLSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDESYNPSLKSRLTISKNTSKNQVSLKITSVTAADTAVYFC
ARX1X2YDPPWFVDWGQGTLVTVSS (ID SEC N°: 24)

X1 es A, V, F, K, o N; X2 es R o K

Fig. 4

AB6

CADENA LIVIANA
DIQMTQSTSSLSASLGDRVTITCRASQDISNYLSWYQQKPGKTVKLLIYYTSKLSHSGVPSRFRSGSGGTDYTLTISSLQQEDFATYFCLGKMLPWT
GQGTKLEIK (ID SEC N°: 10)

CADENA PESADA
QVQLQESGPGLLKPSQTLSTCSFGFSLSSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDESYNPSLKSQLTISKDTSKNQVSLKITSVTAADTATYF
CARNRYDPPWFVVDWGGQGLVTVSS (ID SEC N°: 14)

AB7

CADENA LIVIANA
DIQMTQSTSSLSASVGDRTTTCRASQDISNYLSWYQQKPGKAVKLLIYYTSKLSHSGVPSRFRSGSGGTDYTLTISSLQQEDFATYFCLGKMLPWT
FGQGTKLEIK (ID SEC N°: 11)

CADENA PESADA
QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSFGFSLSSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDESYNPSLKSRLTISKDTSKNQVSLKITSVTAADTAVYF
CARNRYDPPWFVVDWGGQGLVTVSS (ID SEC N°: 15)

Fig. 4A

AB8

CADENA LIVIANA
DIQMTQSTSSLSASLGDRVTITCRASQDISNYLSWYQQKPGKTKLLIYYTISKLHSGVPSRFSGSGGTDYTLTISSLOQEDFATYFCLQGKMLPWT
GQGTKLEIK (ID SEC N°: 10)

CADENA PESADA
QVQLQESGPGLLKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDESYNPSLKSQLTISKNTSKNQVSLKITSVTAADTATYF
CARNRYDPPWFVDWGGGTLVTYSS (ID SEC N°: 25)

AB9

CADENA LIVIANA
DIQMTQSTSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLSWYQQKPGKAVKLLIYYTISKLHSGVPSRFSGSGGTDYTLTISSLOQEDFATYFCLQGKMLPWT
FGQGTKLEIK (ID SEC N°: 11)

CADENA PESADA
QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDESYNPSLKSRLTISKNTSKNQVSLKITSVTAADTAVYF
CARNRYDPPWFVDWGGGTLVTYSS (ID SEC N°: 26)

Fig. 4B

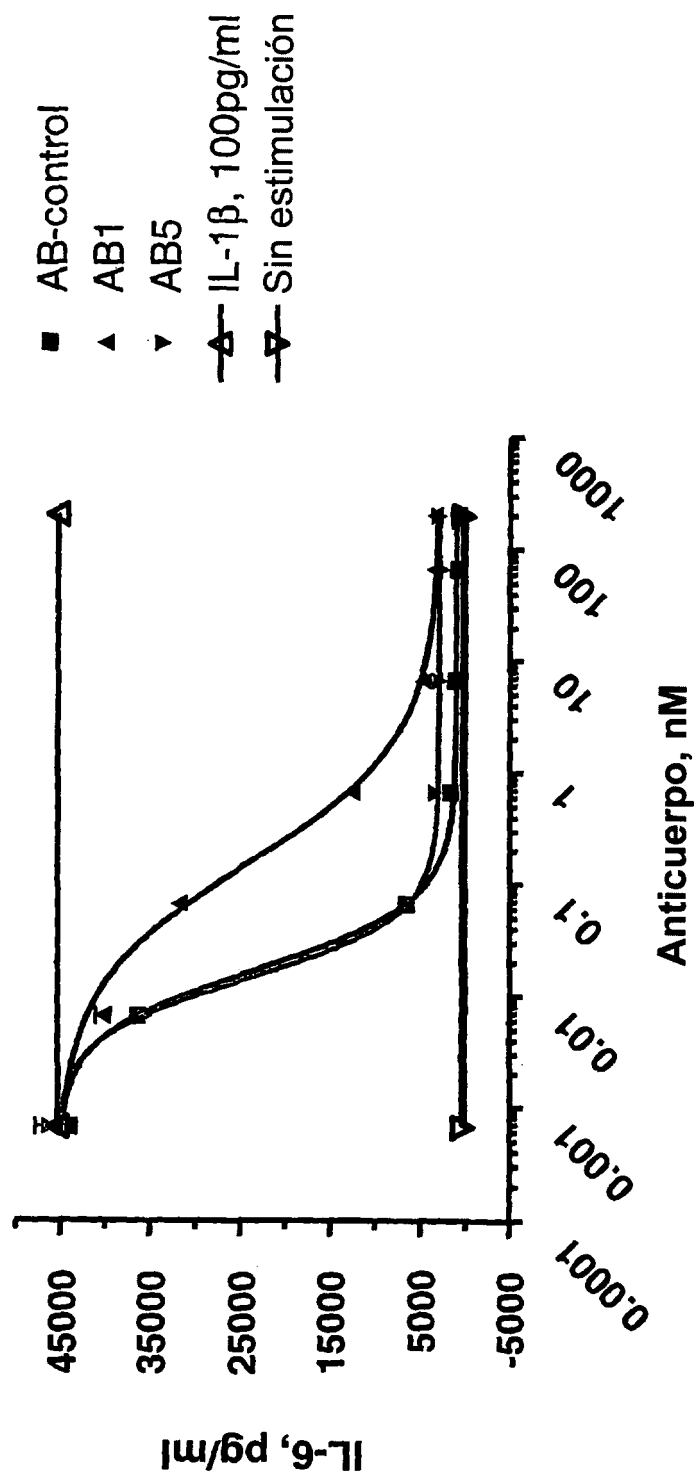


Fig. 5

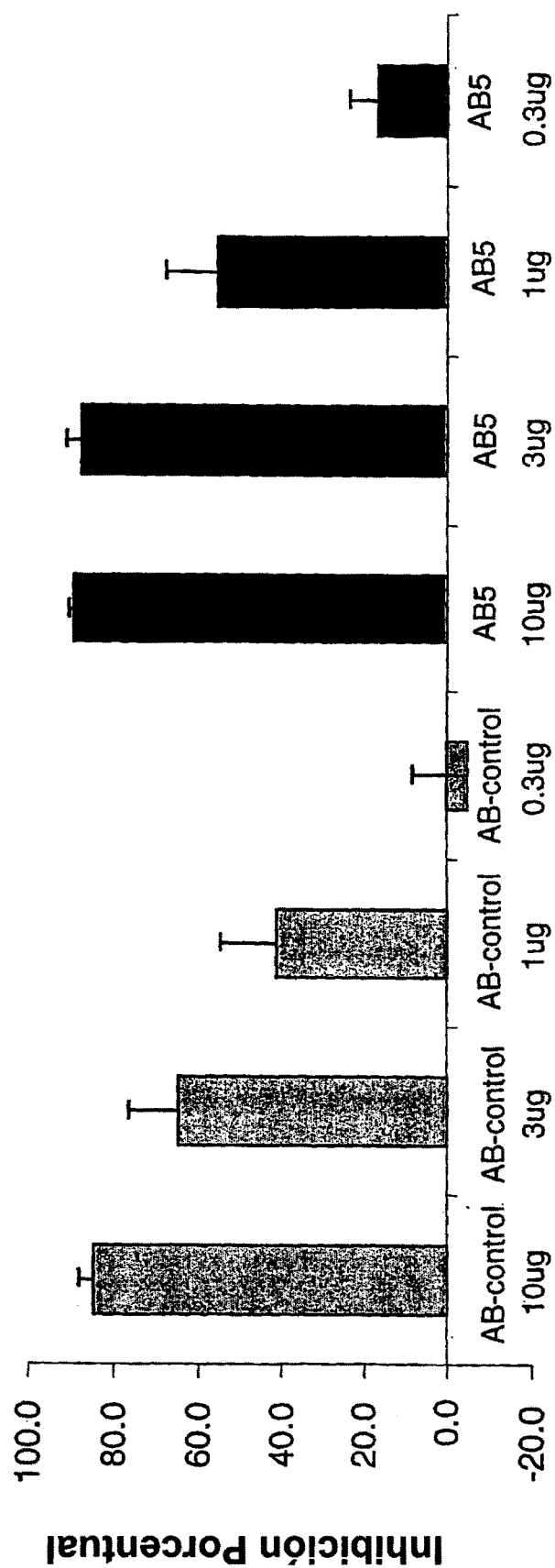


Fig. 6

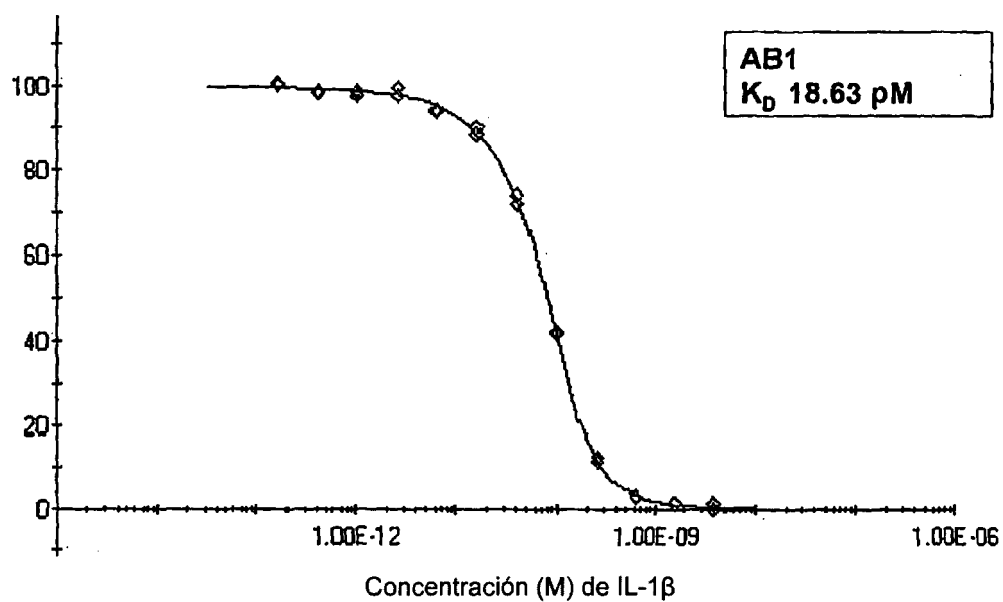


Fig. 7

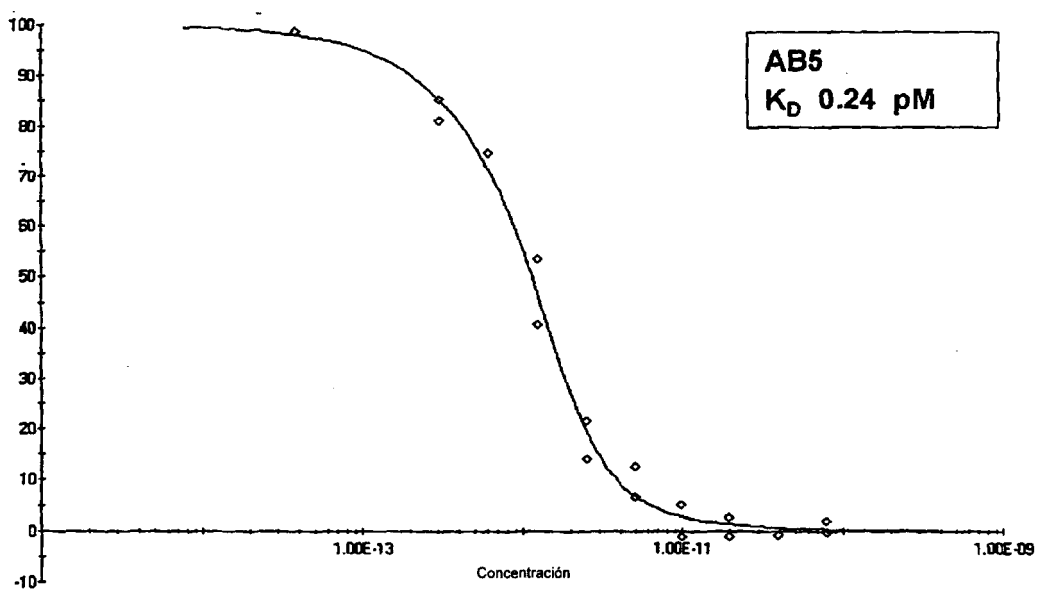


Fig. 8

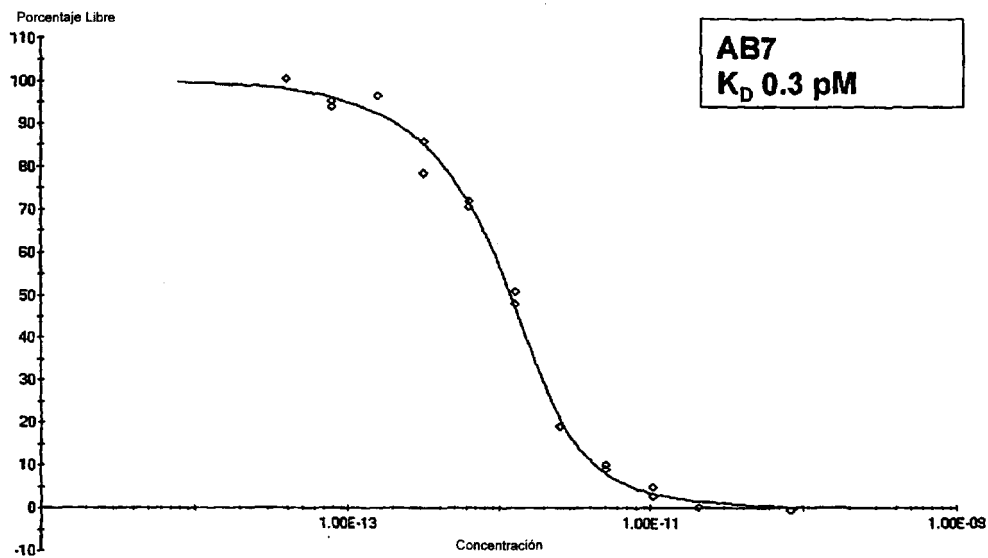


Fig. 9

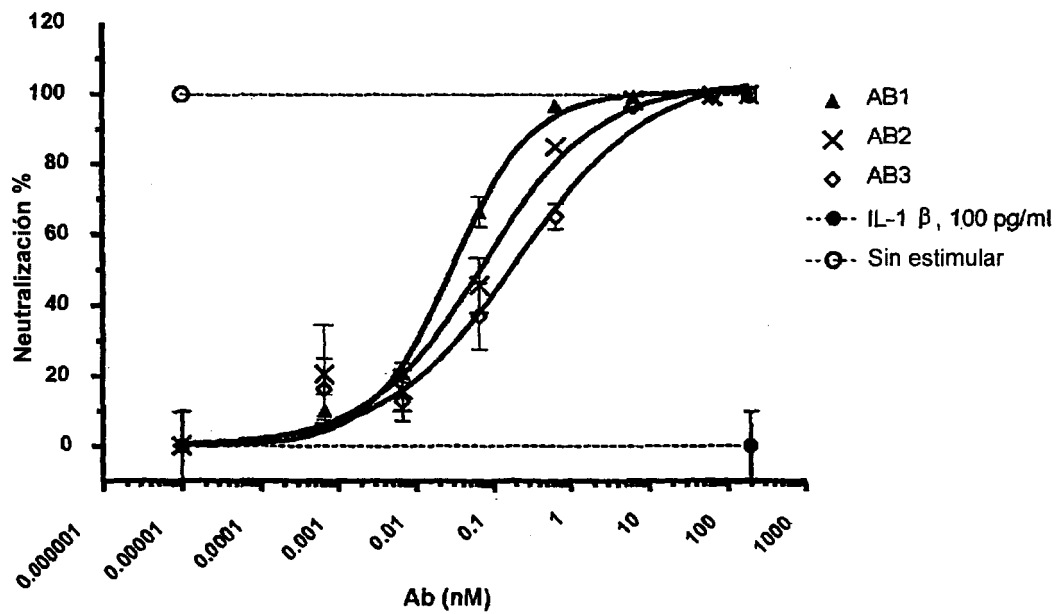


Fig. 10

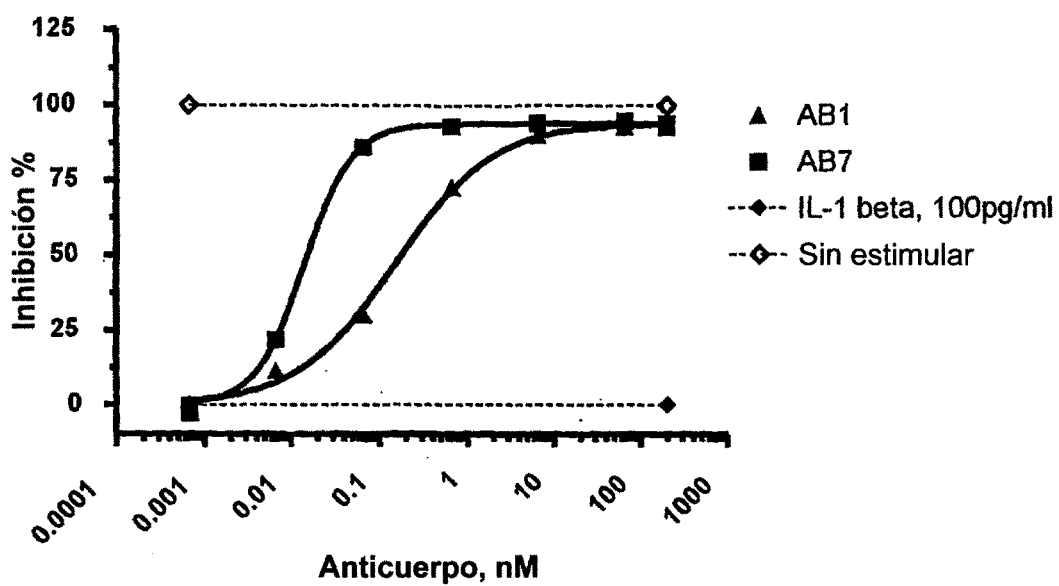


Fig. 11

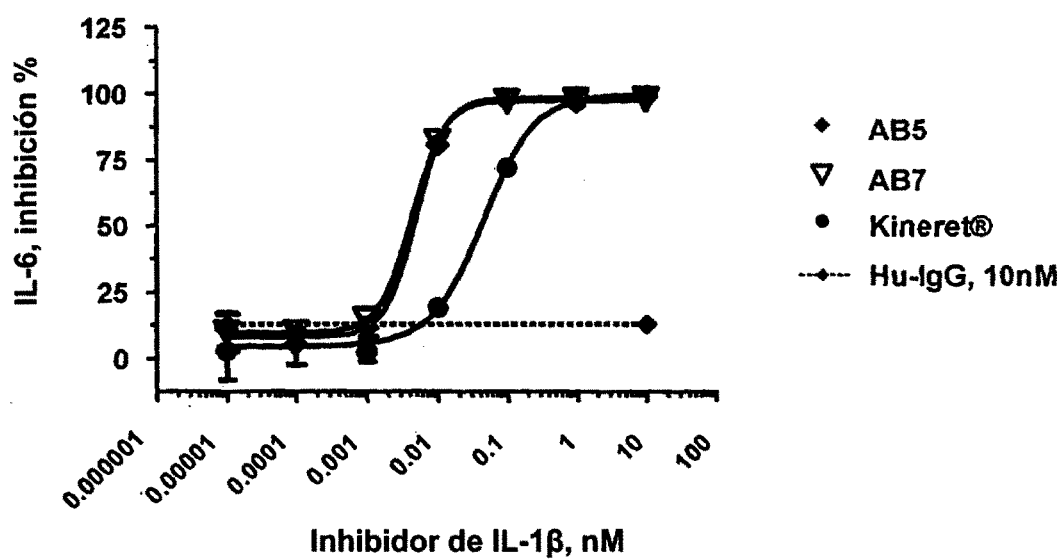


Fig. 12

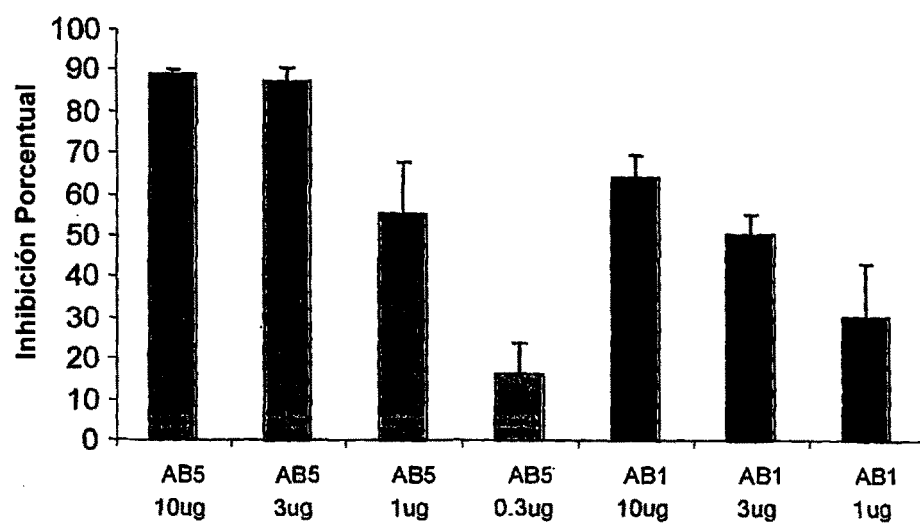


Fig. 13

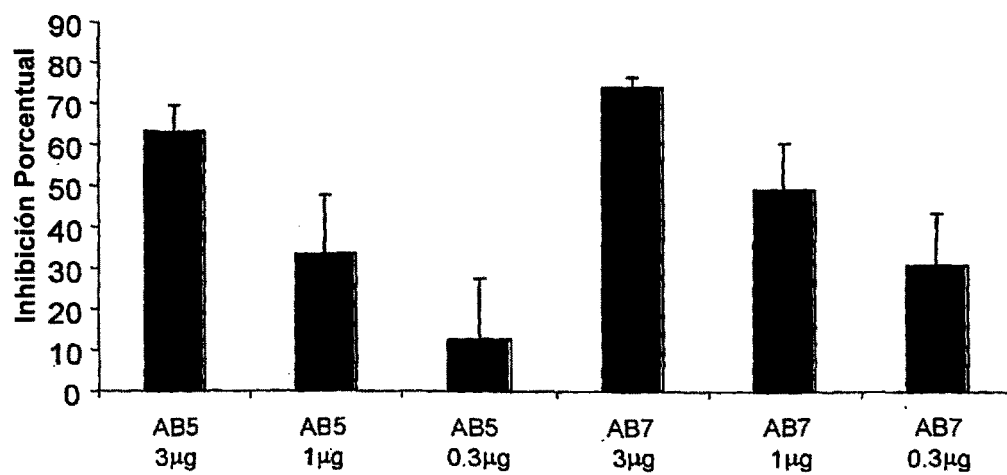


Fig. 14

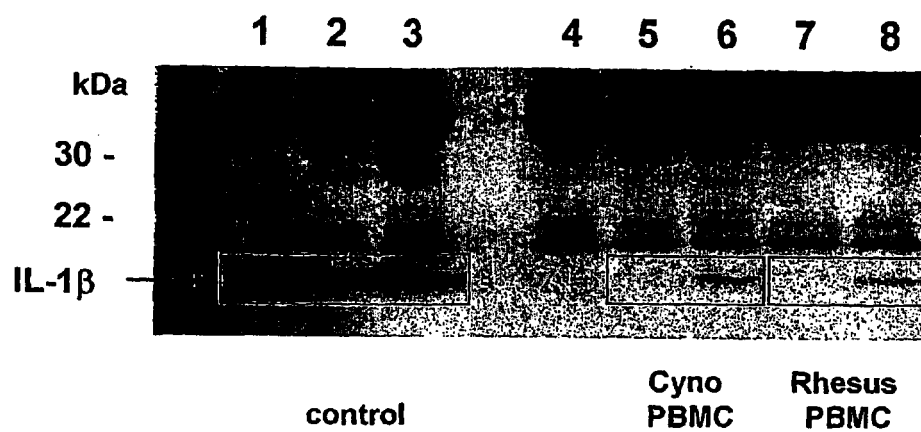


Fig. 15

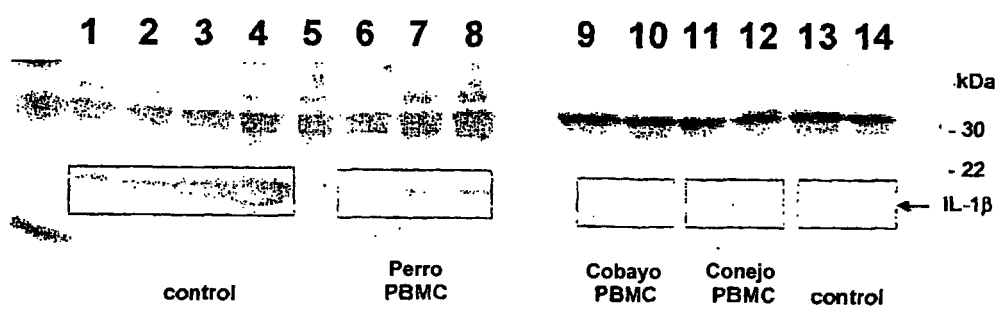
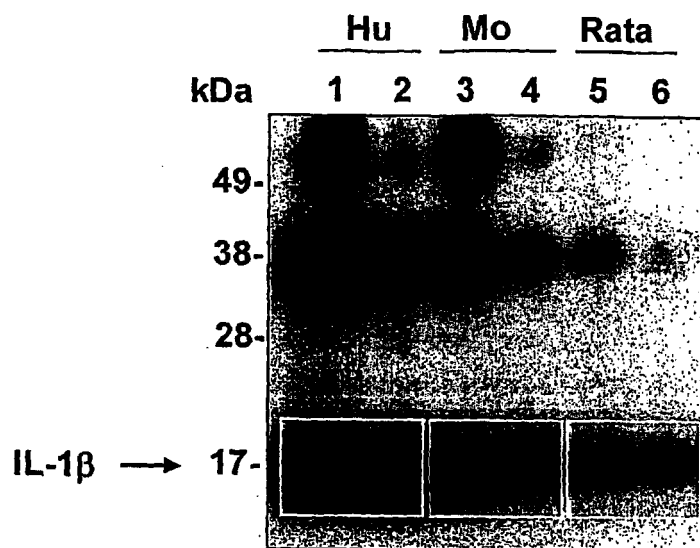


Fig. 16



Western Blot

Fig. 17

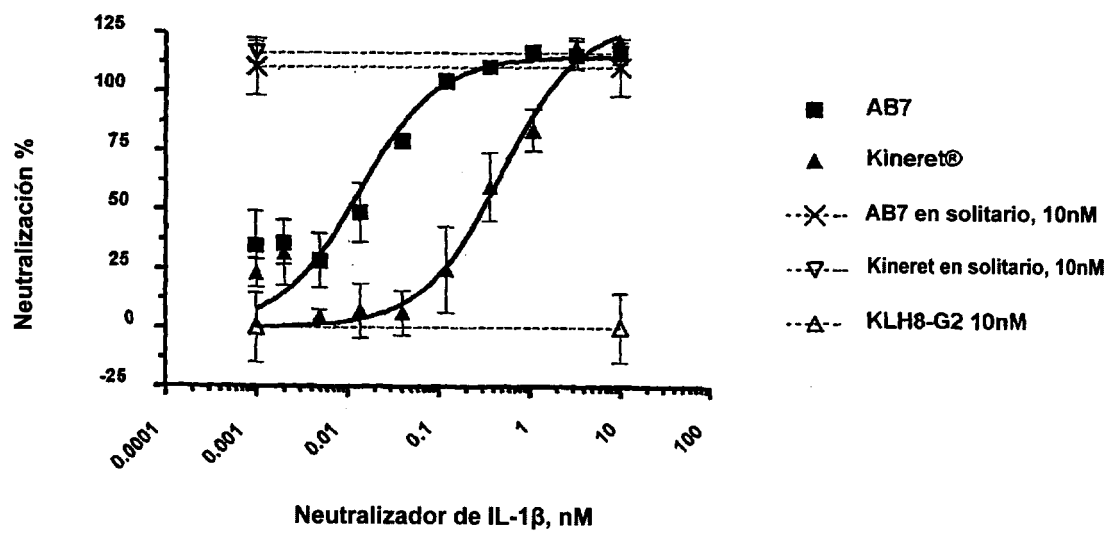


Fig. 18

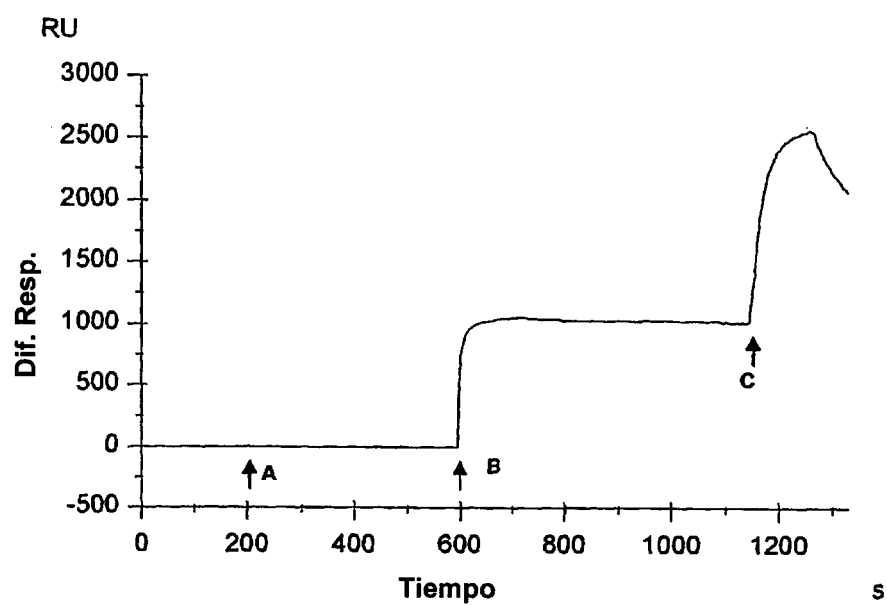


Fig. 19

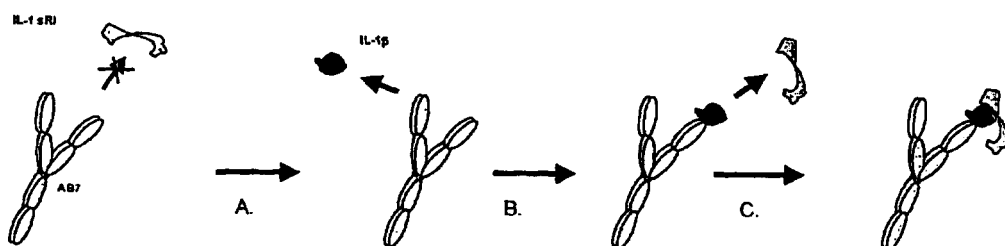


Fig. 20

ES 2 335 232 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> XOMA Technology Ltd.

5 <120> Anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen a la IL-1 β

<130> 17646WO02

10 <160> 57

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Sintética

25 <220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (7)..(7)

30 <223> “Xaa” es Thr o Ser

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC

35 <222> (15)..(15)
<223> “Xaa” es Leu o Val

<220>

40 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (22)..(22)
<223> “Xaa” es Thr o Ser

45 <220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (41)..(41)

50 <223> “Xaa” es Asp o Gly

<220>

55 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (42)..(42)
<223> “Xaa” es Gly o Lys

60 <220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (43)..(43)

65 <223> “Xaa” es Thr o Ala

<220>

ES 2 335 232 T3

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (72)..(72)

<223> "Xaa" es Thr o Ser

5

<400> 1

10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Xaa Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Xaa Gly
1 5 10 15

15

Asp Arg Val Thr Ile Xaa Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

20

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Xaa Xaa Xaa Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

25

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

30

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Xaa Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln Gly Lys Met Leu Pro Trp
85 90 95

35

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

40

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

45

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

50

<222> (3)..(3)

<223> "Xaa" es Thr o Gln

<220>

55

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (5)..(5)

<223> "Xaa" es Lys o Gln

60

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (11)..(11)

65

<223> "Xaa" es Ile o Leu

<220>

ES 2 335 232 T3

<221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (12)..(12)
 <223> “Xaa” es Leu o Val
 5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (67)..(67)
 10 <223> “Xaa” es Thr o Ser
 <220>
 15 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (68)..(68)
 <223> “Xaa” es Gln o Arg
 20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (77)..(77)
 25 <223> “Xaa” es Arg o Lys
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 30 <222> (81)..(81)
 <223> “Xaa” es Phe o Ser
 <220>
 35 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (88)..(88)
 <223> “Xaa” es Asp o Thr
 40 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (89)..(89)
 45 <223> “Xaa” es Thr o Ala
 <220>
 50 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (90)..(90)”
 <223> “Xaa” es Val o Ala
 55 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (94)..(94)
 <223> “Xaa” es Thr o Val
 60 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 65 <222> (100)..(100)
 <223> “Xaa” es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn

ES 2 335 232 T3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (101)..(101)

5 <223> "Xaa" es Arg o Lys

<400> 2

10

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

15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

20

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

25

Leu Lys Xaa Xaa Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Xaa Asn Gln Val
65 70 75 80

30

Xaa Leu Lys Ile Thr Ser Val Xaa Xaa Xaa Asp Thr Ala Xaa Tyr Phe
85 90 95

35

Cys Ala Arg Xaa Xaa Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
100 105 110

40

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

45 <213> Artificial

<220>

50 <223> Sintética

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

55 <222> (1)..(1)

<223> "Xaa" es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn

<220>

60 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (2)..(2)

<223> "Xaa" es Arg o Lys

65

ES 2 335 232 T3

<400> 3

5 Xaa Xaa Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp
1 5 10

<210> 4

10 <211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Sintética

20 <400> 4

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

35 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

40 Leu Lys Thr Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
65 70 75 80

45 Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
85 90 95

50 Cys Ala Arg Ala Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

55

<210> 5

<211> 120

60 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

65 <223> Sintética

ES 2 335 232 T3

<400> 5

5	Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys Pro Ser Gln	1 5 10 15
10	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser	20 25 30
15	Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu	35 40 45
20	Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser	50 55 60
25	Leu Lys Thr Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val	65 70 75 80
30	Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Phe	85 90 95
35	Cys Ala Arg Val Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln	100 105 110
40	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	115 120

<210> 6

<211> 120

40 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

45 <223> Sintética

50

55

60

65

ES 2 335 232 T3

<400> 6

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

10 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

20 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

25 Leu Lys Thr Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
65 70 75 80

30 Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
85 90 95

35 Cys Ala Arg Phe Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
100 105 110

40 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

40 <213> Artificial

<220>

<223> Sintética

45

50

55

60

65

ES 2 335 232 T3

<400> 7

1 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys Pro Ser Gln
 5 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 10 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 15 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
 20 Leu Lys Thr Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
 25 Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
 30 Cys Ala Arg Lys Lys Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
 35 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 40

<210> 8

30 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Sintética

<400> 8

40 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys Pro Ser Gln
 45 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 50 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 55 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
 60 Leu Lys Thr Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
 65 Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
 70 Cys Ala Arg Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
 75 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 80

ES 2 335 232 T3

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Sintética

10

<400> 9

15

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

20

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

25

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

30

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

35

40

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln Gly Lys Met Leu Pro Trp
85 90 95

45

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

<210> 10

<211> 107

50

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

60

65

ES 2 335 232 T3

<400> 10

```

5      Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
      1              5              10              15

10     Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
      20              25              30

15     Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Val Lys Leu Leu Ile
      35              40              45

20     Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50              55              60

25     Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Gln
      65              70              75              80

30     Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln Gly Lys Met Leu Pro Trp
      85              90              95

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

```

<210> 11

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 11

```

45     Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
      1              5              10              15

50     Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
      20              25              30

55     Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile
      35              40              45

60     Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50              55              60

65     Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Gln
      65              70              75              80

70     Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln Gly Lys Met Leu Pro Trp
      85              90              95

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

```

ES 2 335 232 T3

<210> 12
 <211> 120
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sintética
 10
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 15 <222> (100)..(100)
 <223> "Xaa" es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn

 <220>
 20 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (101)..(101)
 <223> "Xaa" es Arg o Lys

 25 <400> 12

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

 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

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

 40 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

 Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

 45 Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
 85 90 95

 50 Cys Ala Arg Xaa Xaa Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
 100 105 110

 55 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 <210> 13
 60 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

 65 <220>
 <223> Sintética

ES 2 335 232 T3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (100)..(100)

5 <223> "Xaa" es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn

<220>

10 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (101)..(101)

<223> "Xaa" es Arg o Lys

15 <400> 13

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

20

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

25

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

30

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

35

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe
85 90 95

40

Cys Ala Arg Xaa Xaa Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
100 105 110

45

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14

50 <211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

55 <220>

<223> Sintética

60

65

ES 2 335 232 T3

<400> 14

5	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Leu Lys Pro Ser Gln	1 5 10 15
10	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser	20 25 30
15	Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu	35 40 45
20	Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser	50 55 60
25	Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val	65 70 75 80
30	Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe	85 90 95
35	Cys Ala Arg Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln	100 105 110
40	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	115 120

35 <210> 15
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Sintética

45

50

55

60

65

ES 2 335 232 T3

<400> 15

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

15 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

20 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe
85 90 95

25 Cys Ala Arg Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
100 105 110

30 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 16

45 Ala Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp
1 5 10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 17

65 Val Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp
1 5 10

ES 2 335 232 T3

<210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sintética
 10
 <400> 18

 15 **Phe Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp**
 1 5 10

 <210> 19
 20 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Sintética
 30 <400> 19

 Lys Lys Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp
 1 5 10
 35
 <210> 20
 <211> 10
 40 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 45 <223> Sintética

 <400> 20

 50 **Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp**
 1 5 10

 55 <210> 21
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Sintética

 65 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

ES 2 335 232 T3

<222> (100)..(100)

<223> "Xaa" es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn

5 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (101)..(101)

10 <223> "Xaa" es Arg o Lys

<400> 21

15	Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys Pro Ser Gln
	1 5 10 15
20	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
	20 25 30
25	Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
	35 40 45
30	Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
	50 55 60
35	Leu Lys Thr Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
	65 70 75 80
40	Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
	85 90 95
45	Cys Ala Arg Xaa Xaa Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
	100 105 110
50	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
	115 120

45 <210> 22

<211> 8

<212> PRT

50 <213> Artificial

<220>

<223> Sintética

55 <400> 22

60	Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp
	1 5

<210> 23

<211> 120

65 <212> PRT

<213> Artificial

ES 2 335 232 T3

<220>
 <223> Sintética

5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (100)..(100)
 10 <223> “Xaa” es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 15 <222> (101)..(101)
 <223> “Xaa” es Arg o Lys

<400> 23

20

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

25

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser
			20					25					30		

30

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

35

Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Gly	Asp	Glu	Ser	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50					55					60				

40

Leu	Lys	Ser	Gln	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asn	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val
65					70					75				80	

45

Ser	Leu	Lys	Ile	Thr	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe
			85					90					95		

50

Cys	Ala	Arg	Xaa	Xaa	Tyr	Asp	Pro	Pro	Trp	Phe	Val	Asp	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		

55

Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
		115				120	

<210> 24
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintética

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (100)..(100)
 <223> “Xaa” es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn

ES 2 335 232 T3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (101)..(101)

5 <223> "Xaa" es Arg o Lys

<400> 24

10

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

15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

20

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

25

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asn Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

30

Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe
85 90 95

35

Cys Ala Arg Xaa Xaa Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
100 105 110

40

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 25

<211> 120

45 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

50 <223> Sintética

55

60

65

ES 2 335 232 T3

<400> 25

5	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Leu Lys Pro Ser Gln	1 5 10 15
10	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser	20 25 30
15	Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu	35 40 45
20	Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser	50 55 60
25	Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asn Thr Ser Lys Asn Gln Val	65 70 75 80
30	Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe	85 90 95
35	Cys Ala Arg Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln	100 105 110
40	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	115 120

35 <210> 26
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Sintética

45 <400> 26

50	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln	1 5 10 15
55	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser	20 25 30
60	Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu	35 40 45

60

65

ES 2 335 232 T3

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

5

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asn Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

10

Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe
85 90 95

15

Cys Ala Arg Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
100 105 110

20

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27

<211> 107

25

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30

<223> Sintética

<220>

35

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (7)..(7)

<223> "Xaa" es Thr o Ser

40

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (15)..(15)

<223> "Xaa" es Leu o Val

45

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

50

<222> (22)..(22)

<223> "Xaa" es Thr o Ser

<220>

55

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (41)..(41)

<223> "Xaa" es Asp o Gly

60

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (42)..(42)

65

<223> "Xaa" es Gly o Lys

<220>

ES 2 335 232 T3

```

<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (43)..(43)
<223> "Xaa" es Thr o Ala
5
<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (72)..(72)
10
<223> "Xaa" es Thr o Ser

<220>
15
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (77)..(77)
<223> "Xaa" es Asn o Ser

20
<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (79)..(79)
25
<223> "Xaa" es Glu o Gln

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
30
<222> (83)..(83)
<223> "Xaa" es Ile o Phe

<220>
35
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (100)..(100)
<223> "Xaa" es Gly o Gln
40
<400> 27

Asp Ile Gln Met Thr Gln Xaa Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Xaa Gly
45 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Xaa Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

50
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Xaa Xaa Xaa Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

55
Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Xaa Leu Thr Ile Ser Xaa Leu Xaa Gln
65 70 75 80

Glu Asp Xaa Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln Gly Lys Met Leu Pro Trp
85 90 95

65
Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

```

ES 2 335 232 T3

<210> 28
 <211> 120
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sintética
 10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 15 <222> (3)..(3)
 <223> “Xaa” es Thr o Gln

 <220>
 20 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (5)..(5)
 <223> “Xaa” es Lys o Gln

 25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (11)..(11)
 30 <223> “Xaa” es Ile o Leu

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 35 <222> (12)..(12)
 <223> “Xaa” es Leu o Val

 <220>
 40 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (67)..(67)
 <223> “Xaa” es Thr o Ser
 45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (68)..(68)
 50 <223> “Xaa” es Gln o Arg

 <220>
 55 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (74)..(74)
 <223> “Xaa” es Asp o Asn

 60 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (77)..(77)
 65 <223> “Xaa” es Arg o Lys

 <220>

ES 2 335 232 T3

<221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (81)..(81)
 <223> “Xaa” es Phe o Ser
 5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (88)..(88)
 10 <223> “Xaa” es Asp o Thr
 <220>
 15 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (89)..(89)
 <223> “Xaa” es Thr o Ala
 20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (90)..(90)
 25 <223> “Xaa” es Val o Ala
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 30 <222> (94)..(94)
 <223> “Xaa” es Thr o Val
 <220>
 35 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (100)..(100)
 <223> “Xaa” es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn
 40 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (101)..(101)
 45 <223> “Xaa” es Arg o Lys

50

55

60

65

ES 2 335 232 T3

<400> 28

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

15 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

20 Leu Lys Xaa Xaa Leu Thr Ile Ser Lys Xaa Thr Ser Xaa Asn Gln Val
65 70 75 80

25 Xaa Leu Lys Ile Thr Ser Val Xaa Xaa Xaa Asp Thr Ala Xaa Tyr Phe
85 90 95

30 Cys Ala Arg Xaa Xaa Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 29

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (3)..(3)

<223> "Xaa" es Thr o Gln

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (5)..(5)

<223> "Xaa" es Lys o Gln

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (11)..(11)

<223> "Xaa" es Ile o Leu

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

ES 2 335 232 T3

<222> (12)..(12)
 <223> “Xaa” es Leu o Val
 5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (67)..(67)
 <223> “Xaa” es Thr o Ser
 10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (68)..(68)
 <223> “Xaa” es Gln o Arg
 15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (74)..(74)
 <223> “Xaa” es Asp o Asn
 20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (77)..(77)
 <223> “Xaa” es Arg o Lys
 25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (81)..(81)
 <223> “Xaa” es Phe o Ser
 30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (88)..(88)
 <223> “Xaa” es Asp o Thr
 35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (89)..(89)
 <223> “Xaa” es Thr o Ala
 40 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (90)..(90)
 <223> “Xaa” es Val o Ala
 45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (94)..(94)
 <223> “Xaa” es Thr o Val
 50 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (94)..(94)
 <223> “Xaa” es Thr o Val
 55 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (94)..(94)
 <223> “Xaa” es Thr o Val
 60 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (94)..(94)
 <223> “Xaa” es Thr o Val
 65 <220>

ES 2 335 232 T3

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (100)..(100)

<223> "Xaa" es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (101)..(101)

<223> "Xaa" es Arg o Lys, pero no es Lys si la posición (100) es Lys

<400> 29

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Xaa Xaa Leu Thr Ile Ser Lys Xaa Thr Ser Xaa Asn Gln Val
65 70 75 80

Xaa Leu Lys Ile Thr Ser Val Xaa Xaa Xaa Asp Thr Ala Xaa Tyr Phe
85 90 95

Cys Ala Arg Xaa Xaa Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(1)

<223> "Xaa" es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (2)..(2)

<223> "Xaa" es Arg o Lys, pero no es Lys si la posición (1) es Lys

ES 2 335 232 T3

<400> 30

5 Xaa Xaa Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp
1 5 10

<210> 31

10 <211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Sintética

<220>

20 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (100)..(100)

<223> "Xaa" es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn

25 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (101)..(101)

30 <223> "Xaa" es Arg o Lys, pero no es Lys si la posición (100) es Lys

<400> 31

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

40 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

45 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

50 Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

55 Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
85 90 95

Cys Ala Arg Xaa Xaa Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
100 105 110

60 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 32

65 <211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 335 232 T3

<220>

<223> Sintética

5 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (100)..(100)

10 <223> "Xaa" es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

15 <222> (101)..(101)

<223> "Xaa" es Arg o Lys, pero no es Lys si la posición (100) es Lys

<400> 32

20

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

25

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

30

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

35

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

40

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

45

Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe
85 90 95

50

Cys Ala Arg Xaa Xaa Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
100 105 110

55

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 33

<211> 120

<212> PRT

60

<213> Artificial

<220>

65 <223> Sintética

<220>

ES 2 335 232 T3

<221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (100)..(100)
 <223> "Xaa" es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn
 5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (101)..(101)
 10 <223> "Xaa" es Arg o Lys, pero no es Lys si la posición (100) es Lys
 <400> 33
 15 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 25 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 30 Leu Lys Thr Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
 65 70 75 80
 35
 Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
 40 85 90 95
 Cys Ala Arg Xaa Xaa Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
 45 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 50 <210> 34
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> Sintética
 60 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (100)..(100)
 65 <223> "Xaa" es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn
 <220>

ES 2 335 232 T3

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (101)..(101)

<223> "Xaa" es Arg o Lys, pero no es Lys si la posición (100) es Lys

5

<400> 34

10

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

15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

20

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

25

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

30

Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asn Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

35

Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
85 90 95

40

Cys Ala Arg Xaa Xaa Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35

45

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

50

<220>

<223> Sintética

<220>

55

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (100)..(100)

<223> "Xaa" es Ala, Val, Phe, Lys, o Asn

60

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (101)..(101)

65

<223> "Xaa" es Arg o Lys, pero no es Lys si la posición (100) es Lys

ES 2 335 232 T3

<400> 35

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

15 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

20 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asn Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe
85 90 95

25 Cys Ala Arg Xaa Xaa Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
100 105 110

30 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

35 115 120

<210> 36

40 <211> 23

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

45 <400> 36

50 Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys Met Glu Lys Arg
1 5 10 15

Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu
20

55 <210> 37
<211> 5

<212> PRT

60 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia enlazadora

65

ES 2 335 232 T3

<400> 37

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

5

<210> 38

<211> 360

<212> DNA

10

<213> Artificial

<220>

15

<223> Sintética

<400> 38

20

caagtacaac ttcaagaaag cgggccaggc cttgttaaac cctcccaaac tttttctctt
60

acctgttctt tctctggatt ctctctctct acctctggca tgggcgctcg ctggatacgt
120

25

caaccaagtg gaaaaggact cgaatggctt gcacatatat ggtgggatgg cgacgaatct
180

tataaccctt ctcttaaact tcgacttaca atttctaaag acacttccaa aaaccaagtt
240

30

tcctcaaaa taacctccgt cactgctgca gatactgctg tctatttttg cgcacgaaac
300

35

agatatgac cccctgggtt cgttgattgg ggccaaggaa cactcgtaac cgttagctca
360

<210> 39

40

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

45

<223> Sintética

<400> 39

50

gacatccaaa tgactcaatc cacttcctca ctctcagcct ctgtcggaga ccgtgtaact
60

atcacctgcc gtgcttccca agacatctct aattatctct cctggatatca acaaaaacct
120

55

ggtaaagctg ttaaacttct catttattat acttctaaac ttcactccgg tgtgccttct
180

cgtttctcag gatcaggctc aggaaccgac tataactca ccatctctc cctccaacaa
240

60

gaagacttcg ctacttactt ttgccttcaa ggaaaaatgc tcccctggac ttccggacaa
300

65

ggaacaaagc tcgaaattaa a
321

ES 2 335 232 T3

<210> 40
 <211> 120
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sintética
 10
 <400> 40

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

 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 20 25 30

 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 25 35 40 45

 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
 30 50 55 60

 Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asn Thr Ser Arg Asn Gln Val
 35 65 70 75 80

 Phe Leu Lys Ile Thr Thr Val Asp Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
 40 85 90 95

 Cys Ala Arg Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
 45 100 105 110

 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 50 115 120

 <210> 41
 <211> 107
 <212> PRT
 50 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sintética
 55

 60

 65

ES 2 335 232 T3

<400> 41

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

5

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

10

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

15

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Phe Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

20

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln Gly Lys Met Leu Pro Trp
85 90 95

25

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

<210> 42

<211> 120

<212> PRT

30

<213> Artificial

<220>

35

<223> Sintética

<400> 42

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

40

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

45

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

50

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

55

Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
85 90 95

60

Cys Ala Arg Ala Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
100 105 110

65

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

ES 2 335 232 T3

<210> 43

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Sintética

10

<400> 43

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

20 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

25 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

30 Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
85 90 95

35 Cys Ala Arg Val Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
100 105 110

40 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

45 <210> 44

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

50

<220>

<223> Sintética

55

60

65

ES 2 335 232 T3

<400> 44

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

5

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

10

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

15

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

20

Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
85 90 95

25

Cys Ala Arg Phe Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

30

<210> 45

<211> 120

<212> PRT

35 <213> Artificial

<220>

<223> Sintética

40

<400> 45

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

45

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

50

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

55

Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

60

Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
85 90 95

Cys Ala Arg Lys Lys Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
100 105 110

65

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

ES 2 335 232 T3

<210> 46
 <211> 120
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sintética
 10
 <400> 46

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

 20
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 25
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 30
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 35
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 40
 Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe
 85 90 95
 45
 Cys Ala Arg Ala Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
 100 105 110
 50
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 55
 <210> 47
 <211> 120
 <212> PRT
 60 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sintética
 65

ES 2 335 232 T3

<400> 47

5	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln	1 5 10 15
10	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser	20 25 30
15	Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu	35 40 45
20	Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser	50 55 60
25	Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val	65 70 75 80
30	Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe	85 90 95
35	Cys Ala Arg Val Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln	100 105 110
40	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	115 120

<210> 48

<211> 120

45 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

50 <223> Sintética

55

60

65

ES 2 335 232 T3

<400> 48

5	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln	1 5 10 15
10	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser	20 25 30
15	Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu	35 40 45
20	Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser	50 55 60
25	Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val	65 70 75 80
30	Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe	85 90 95
35	Cys Ala Arg Phe Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln	100 105 110
40	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	115 120

35 <210> 49
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Sintética

45

50

55

60

65

ES 2 335 232 T3

<400> 49

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

10 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

20 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

25 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

30 Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe
85 90 95

35 Cys Ala Arg Lys Lys Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
100 105 110

40 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 50

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 50

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

60 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

ES 2 335 232 T3

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 5 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 10 Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asn Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
 85 90 95
 15 Cys Ala Arg Ala Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
 100 105 110
 20 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 51
 25 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Sintética
 35 <400> 51

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Leu Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 40 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 45 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 50 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asn Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 55 Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
 85 90 95
 60 Cys Ala Arg Val Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 65

<210> 52

ES 2 335 232 T3

<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Sintética

10 <400> 52

15 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Leu Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 20 25 30
Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
25 50 55 60
Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asn Thr Ser Lys Asn Gln Val
30 65 70 75 80
Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
85 90 95
Cys Ala Arg Phe Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
35 100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
40 115 120

<210> 53
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> Sintética

55

60

65

ES 2 335 232 T3

<400> 53

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

10 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

20 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

25 Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asn Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

30 Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
85 90 95

35 Cys Ala Arg Lys Lys Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
100 105 110

40 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

35 <210> 54
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> Sintética

45 <400> 54

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

55 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

65 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

ES 2 335 232 T3

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asn Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

5 Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe
 85 90 95

10 Cys Ala Arg Ala Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
 100 105 110

15 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 55
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 55

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

35 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

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

45 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

50 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asn Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

55 Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe
 85 90 95

60 Cys Ala Arg Val Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
 100 105 110

65 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 56
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

ES 2 335 232 T3

<223> Sintética

<400> 56

5
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 10
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 15
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 20
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 25
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asn Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 30
 Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe
 85 90 95
 35
 Cys Ala Arg Phe Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 57

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 57

50
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 55
 60
 65

ES 2 335 232 T3

	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser
				20					25					30		
5	Gly	Met	Gly	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Ser	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
			35					40					45			
10	Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Gly	Asp	Glu	Ser	Tyr	Asn	Pro	Ser
		50					55						60			
15	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asn	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val
	65					70					75					80
20	Ser	Leu	Lys	Ile	Thr	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe
				85						90					95	
25	Cys	Ala	Arg	Lys	Lys	Tyr	Asp	Pro	Pro	Trp	Phe	Val	Asp	Trp	Gly	Gln
				100					105					110		
30	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
			115					120								
35																
40																
45																
50																
55																
60																
65																