

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 953**

51 Int. Cl.:
C07K 16/24 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04708808 .3**
96 Fecha de presentación: **06.02.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1597282**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.11.2005**

54 Título: **MOLÉCULAS DE ANTICUERPOS CON ESPECIFICIDAD PARA IL-1 BETA HUMANA.**

30 Prioridad:
13.02.2003 GB 0303337

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.02.2012

73 Titular/es:
UCB PHARMA, S.A.
ALLÉE DE LA RECHERCHE 60
1070 BRUSSELS, BE

72 Inventor/es:
LAWSON, Alastair D. G. y
POPPELWELL, Andrew G.

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 373 953 T3

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

DESCRIPCIÓN

Moléculas de anticuerpos con especificidad para IL-1 beta humana.

5 La presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo con especificidad para determinantes antigénicos de IL-1 β . La presente invención se refiere también a los usos terapéuticos de la molécula de anticuerpo y a métodos para producir la molécula de anticuerpo.

10 La citoquina pro-inflamatoria interleuquina-1 β (IL-1 β) es un miembro de la familia de genes de IL-1 que también incluye IL-1 α y el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1RA) (revisado por Dinarello, 1996, Blood, 87, 6, 2095-2147). IL-1 β está principalmente implicada en la inflamación y tiene efectos directos sobre las células endoteliales y macrófagos, así como sobre células tanto T como B. Estimula las células del estroma de la médula ósea para producir IL-6 así como un cierto número de factores estimulantes de colonias y también induce la producción de TNF α .

15 IL-1 β está implicada en muchas afecciones patológicas que están asociadas con la inflamación. Éstas incluyen infecciones (virales, bacterianas, fúngicas y parasitarias), choque endotóxico, artritis, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria pélvica, esclerosis múltiple, asma, osteoartritis, psoriasis, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Crohn, enfermedad de Peyronie, enfermedades del corazón (tal como aterosclerosis), cáncer de colon, enfermedad celiaca, enfermedad de la vesícula biliar, enfermedad pilonidal, peritonitis, meningoencefalitis, otras afecciones autoinmunes, pancreatitis, trauma (cirugía), enfermedad de injerto frente a hospedante y rechazo de trasplantes.

20 IL-1 β está también implicada en el cáncer, la osteoporosis y la señalización del dolor.

25 La implicación de IL-1 β en la inflamación, el dolor y otras afecciones patológicas sugiere que IL-1 β es una buena diana para fármacos y otras moléculas para la profilaxis y/o el tratamiento de estas afecciones.

30 La forma madura de 17 kDa de IL-1 β ejerce sus efectos biológicos al unirse al receptor de IL-1, IL-1R. Existen dos tipos de IL-1R: el receptor de tipo I, IL-1RI y el receptor de tipo II, IL-1RII. La unión de IL-1 β a IL-1RI conduce al reclutamiento de la proteína accesoria del receptor y a la señalización. Por otra parte, IL-1RII ha sido denominado un receptor de "señuelo", dado que la unión de IL-1 β no transduce una señal. Se puede esperar que sean al menos tres tipos de anticuerpos los que se unan a IL-1 β :

35 (i) anticuerpos que se unen a IL-1 β , pero que no neutralizan la actividad biológica de IL-1RI (un anticuerpo no neutralizante);

(ii) anticuerpos que se unen a IL-1 β y que neutralizan la actividad biológica de IL-1RI al bloquear la unión al IL-1RI; y

40 (iii) anticuerpos que se unen a IL-1 β y que neutralizan la actividad biológica de IL-1RI, pero que no bloquean la unión al IL-1RI tales como los anticuerpos descritos en el documento US 2003/0026806.

Anticuerpos anti-IL-1 β han sido identificados y propuestos para su uso en el tratamiento de enfermedades y afecciones mediadas por IL-1 β ; véase, por ejemplo, el documento WO 95/01997.

45 Los autores de la invención han identificado ahora un anticuerpo de IL-1 β mejorado que es particularmente eficaz *in vivo*, por ejemplo en los modelos de inflamación *in vivo* descritos en esta memoria. El anticuerpo es un anticuerpo neutralizante según se define en la alternativa (ii) anterior.

Sumario de la invención

50 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo neutralizante con especificidad para IL-1 β humana, que comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende una CDR (siglas inglesas de región determinante de la complementariedad) con la secuencia dada en SEQ ID NO:5 para CDR-H1, una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:6 para CDR-H2 y una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:7 para CDR-H3, y una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera

comprende una CDR (región determinante de la complementariedad) que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:8 para CDR-L1, una CDR que tiene una secuencia dada en SEQ ID NO: 9 para CDR-L2 y una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:10 para CDR-L3.

5 Los residuos en los dominios variables del anticuerpo se enumeran convencionalmente de acuerdo con un sistema diseñado por Kabat *et al.* Este sistema se recoge en Kabat *et al.*, 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, EE.UU. (en lo que sigue "Kabat *et al. (supra)*"). Este sistema de numeración se utiliza en la presente memoria descriptiva, excepto cuando se indique de otro modo.

10 Las designaciones de residuos según Kabat no siempre se corresponden directamente con la numeración lineal de los residuos aminoácidos. La secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales que en la numeración estricta según Kabat que corresponde a un acortamiento de o inserción en un componente estructural, ya sea marco o CDR, de la estructura de dominio variable básica. La numeración de residuos correcta según Kabat se puede determinar para un anticuerpo dado mediante alineación de
15 residuos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada según Kabat "estándar".

Las CDRs del dominio variable de la cadena pesada están situadas en los residuos 31-35 (CDR-H1), residuos 50-65 (CDR-H2) y residuos 95-102 (CDR-H3) de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, de acuerdo con Chothia (Chothia, C. y Lesk, A. M. J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)), el bucle equivalente a CDR-H1 se
20 extiende desde el residuo 26 al residuo 32. Así, "CDR-H1", tal como se utiliza en esta memoria, comprende los residuos 26 a 35 según se describe por una combinación del sistema de numeración según Kabat y la definición de bucle topológico según Chothia.

Las CDRs del dominio variable de la cadena ligera están situadas en los residuos 24-34 (CDR-L1), residuos 50-56 (CDR-L2) y residuos 89-97 (CDR-L3) de acuerdo con el sistema de numeración según Kabat. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "anticuerpo neutralizante" describe un anticuerpo que es capaz de neutralizar la actividad de señalización biológica de IL-1 β , en particular bloqueando la unión de IL-1 β al IL-1RI.

Incluso más preferiblemente, el anticuerpo del primer aspecto de la presente invención comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:3.

Incluso más preferiblemente, el anticuerpo del primer aspecto de la presente invención comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:4.

35 El anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:5 para CDR-H1, la secuencia dada en SEQ ID NO:6 para CDR-H2 y la secuencia dada en SEQ ID NO:7 para CDR-H3, y una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:8 para CDR-L1, la secuencia dada en SEQ ID NO:9 para CDR-L2 y la secuencia dada en SEQ ID NO:10 para CDR-L3

40 En una realización más preferida de la invención, el anticuerpo comprende una cadena pesada en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 3 y una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 4.

45 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo de acuerdo con cualquiera del primer aspecto de la invención, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 3 y una cadena ligera, en donde el dominio
50 variable de la cadena ligera comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 4.

En una realización alternativamente preferida, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal murino, en donde el anticuerpo monoclonal comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 3, y en donde el dominio variable de la cadena
55 ligera comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 4. A este anticuerpo monoclonal murino se le alude en esta memoria como "IC8" o como el anticuerpo "donante" o como el "anticuerpo monoclonal murino". Las secuencias de

nucleótidos y aminoácidos completas de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo monoclonal de ratón IC8 se muestran en la Figura 1 y se dan SEQ ID NOs: 1 a 4. Las CDRs dadas en SEQ ID NOs: 5 a 10 se derivan del anticuerpo monoclonal murino IC8.

5 En otro aspecto de la invención, se proporciona una molécula de anticuerpo injertada a CDR, en donde una o más de las CDRs se han obtenido a partir del anticuerpo monoclonal murino IC8. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "molécula de anticuerpo injertada a CDR" se refiere a una molécula de anticuerpo en donde la cadena pesada y/o ligera contiene una o más CDRs (incluidas, si se desea, una o más CDRs modificadas) procedentes de un anticuerpo donante (p. ej., un anticuerpo monoclonal murino) injertadas en un marco de la región variable de la
10 cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo aceptor (p. ej., un anticuerpo humano). Para un revisión, véase, Vaughan et al, Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998.

Cuando las CDRs están injertadas, se puede utilizar cualquier secuencia del marco de la región variable del aceptor apropiada, teniendo en cuenta la clase/tipo del anticuerpo donante del que se derivan las CDRs, incluidas regiones del marco de ratón, primate y ser humano. Preferiblemente, el anticuerpo injertado a CDR de la presente invención tiene un dominio variable que comprende regiones del marco del aceptor humano así como una o más de las CDRs derivadas del anticuerpo donante tal como se alude arriba. Así, se proporciona un anticuerpo injertado a CDR neutralizante, en donde el dominio variable comprende regiones de marco del aceptor humano y CDRs donantes no humanas.

20 Ejemplos de marcos humanos que pueden utilizarse en la presente invención son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat *et al.*, *supra*). Por ejemplo, KOL y NEWM se pueden utilizar para la cadena pesada, REI se puede utilizar para la cadena ligera y EU, LAY y POM se pueden utilizar tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera. Alternativamente, se pueden utilizar secuencias de la línea germinal humana.

25 En un anticuerpo injertado a CDR de la presente invención, las cadenas pesada y ligera del aceptor no requieren necesariamente derivarse del mismo anticuerpo y pueden, si se desea, comprender cadenas compuestas con regiones de marco derivadas de cadenas diferentes.

30 La región de marco preferida para la cadena pesada del anticuerpo injertado a CDR de la presente invención se deriva de la secuencia 3-11 del subgrupo VH3 humano (DP-35) mostrada en la Figura 3 (SEQ ID NO:12) junto con JH4. Por consiguiente, se proporciona un anticuerpo injertado a CDR neutralizante que comprende al menos una CDR donante no humana, en donde la región del marco de la cadena pesada se deriva de la secuencia 3-11 del subgrupo humano (DP-35) junto con JH4. La secuencia de JH4 humana es como sigue:
35 (YFDY)WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 74). El motivo YFDY es parte de CDR-H3 y no es parte del marco 4 (Ravetch, J.V. et al. 1981, Cell, 27, 583-591). La secuencia donante es la secuencia VH de IC8 (SEQ ID NO: 11) mostrada en la Figura 3a.

40 La región del marco preferida para la cadena ligera del anticuerpo injertado a CDR de la presente invención se deriva de la secuencia 012 de VK1 del subgrupo de la línea germinal humana (DPK9) mostrada en la Figura 3 (SEQ ID NO: 17) junto con JK1. Por consiguiente, se proporciona un anticuerpo injertado a CDR neutralizante que comprende al menos una CDR donante no humana, en donde la región del marco de la cadena ligera se deriva de la secuencia 012 (DPK9) del subgrupo humano junto con JK1. La secuencia JK1 es como sigue: (WT)FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 75). El motivo WT es parte de CDR-L3 y no es parte del marco 4 (Hieter, PA, et al., 1982, J. Biol. Chem., 257, 1516-1522). La secuencia donante es la secuencia VL de IC8 (SEQ ID NO: 16) mostrada en la Figura 3b.

45 También, en un anticuerpo injertado a CDR de la presente invención, las regiones de marco no requieren tener exactamente la misma secuencia que las del anticuerpo aceptor. Por ejemplo, residuos inusuales se pueden cambiar a residuos que se producen con mayor frecuencia para esa clase o tipo de cadena del aceptor. Alternativamente, residuos seleccionados en las regiones de marco del aceptor se pueden cambiar de modo que correspondan al residuo encontrado en la misma posición en el anticuerpo donante (véase Reichmann et al. Nature, 332, 323-324, 1988). Cambios de este tipo deberían mantenerse en un mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo donante. En el documento WO 91/09967 se recoge un protocolo para seleccionar residuos en las regiones de marco del aceptor que puede ser necesario cambiar.

55 Preferiblemente, en una molécula de anticuerpo injertada a CDR de la presente invención, si la cadena pesada del

5 aceptor tiene la secuencia DP-35+JH4 humana, entonces las regiones de marco del aceptor de la cadena pesada comprenden, además de una o más CDRs de donante, un residuo donante en la posición 44 (de acuerdo con Kabat et al., (supra)). No se esperaba el efecto sorprendente sobre la afinidad de cambiar el residuo 44 por un residuo donante. Así, en cualquier proceso de humanización de anticuerpos, merecerá la pena examinar adicionalmente el efecto de tener el residuo 44 como un residuo donante o aceptor. Por consiguiente, se proporciona un anticuerpo injertado a CDR, en donde al menos el residuo en la posición 44 del dominio variable de la cadena pesada es un residuo donante.

10 Alternativa o adicionalmente, si la cadena pesada del aceptor tiene la secuencia DP-35+JH4 humana, entonces las regiones de marco del aceptor de la cadena pesada comprenden preferiblemente, además de una o más CDRs donantes, un residuo donante en la posición 89 (de acuerdo con Kabat et al., supra). Por consiguiente, se proporciona un anticuerpo injertado a CDR, en donde al menos el residuo en la posición 44 y/o en la posición 89 del dominio variable de la cadena pesada es un residuo donante.

15 Preferiblemente, en una molécula de anticuerpo injertada a CDR de acuerdo con la presente invención, si la cadena ligera del aceptor tiene la secuencia DPK9+JK1 del subgrupo humano, entonces las regiones de marco del aceptor de la cadena ligera comprenden residuos donantes en las posiciones 45, 70 y 85 y pueden comprender, adicionalmente, residuos donantes en las posiciones 40 y 48 (de acuerdo con Kabat et al., supra). Por consiguiente, se proporciona un anticuerpo injertado a CDR, en donde al menos el residuo en la posición 40, 45, 48, 70 y/u 85 es un residuo donante. También se proporciona un anticuerpo injertado a CDR, en donde los residuos en las posiciones 20 45, 70 y 85 son residuos donantes.

25 Residuos donantes son residuos procedentes del anticuerpo donante, es decir el anticuerpo del que se derivaron originalmente las CDRs que, en el caso de la presente invención, es el anticuerpo monoclonal murino IC8.

 En una realización alternativa de la presente invención, la cadena pesada comprende preferiblemente la secuencia de gH1 (SEQ ID NO: 13), gH2 (SEQ ID NO: 14) o gH3 (SEQ ID NO: 15). Las secuencias de los dominios variables de estas cadenas pesadas injertadas se muestran en la Figura 3a.

30 En una realización alternativa de la presente invención, la cadena ligera comprende preferiblemente la secuencia de gL1 (SEQ ID NO: 18), gL2 (SEQ ID NO: 19) o gL3 (SEQ ID NO: 20). Las secuencias de los dominios variables de estas cadenas pesadas injertadas se muestran en la Figura 3b.

35 Más preferiblemente, una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de gH1 (SEQ ID NO: 13), gH2 (SEQ ID NO: 14) o gH3 (SEQ ID NO: 15) y una cadena ligera que comprende la secuencia de gL1 (SEQ ID NO: 18), gL2 (SEQ ID NO: 19) o gL3 (SEQ ID NO: 20).

40 Incluso más preferiblemente, la cadena pesada de la molécula de anticuerpo de la presente invención comprende el dominio variable gH3 (SEQ ID NO: 15), y la cadena ligera de la molécula de anticuerpo de la presente invención comprende el dominio variable gL3 (SEQ ID NO: 20).

45 Además de ello, se proporciona un anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos de la presente invención, que se une al mismo epítipo que IC8. Alternativamente, se proporciona un anticuerpo neutralizante con especificidad para IL-1 β humana, el cual se une al mismo epítipo que un anticuerpo cuya cadena pesada comprende la secuencia gH3 (SEQ ID NO: 15), y cuya cadena ligera comprende la secuencia gL3 (SEQ ID NO: 20).

50 La molécula de anticuerpo de la presente invención puede comprender una molécula de anticuerpo completa con cadenas pesada y ligera de longitud completa o un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o scFv. Alternativamente, puede comprender un monómero o dímero de cadena ligera o cadena pesada o un anticuerpo de cadena sencilla, p. ej. un Fv de cadena sencilla, en el que los dominios variables de las cadenas pesada y ligera están unidos mediante un enlazador peptídico. De manera similar, las regiones variables de las cadenas pesada y ligera pueden combinarse con otros dominios de anticuerpos, según sea apropiado.

55 La molécula de anticuerpo de la presente invención puede tener una molécula de efector o una molécula de informador fijada a la misma. Por ejemplo, puede tener un macrociclo para quelar un átomo de metal pesado, o una toxina tal como ricina, fijada a la misma por una estructura de puenteo covalente.

Preferiblemente, el anticuerpo de la presente invención se puede modificar para permitir que una molécula de efector o informador sea fijada al mismo. Lo más preferiblemente, la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab modificado según se describe más abajo.

5 Alternativamente, se pueden utilizar procesos de tecnología de ADN recombinante para producir una molécula de anticuerpo en la que el fragmento Fc (dominios CH2, CH3 y de bisagra), los dominios CH2 y CH3 o el dominio CH3 de una molécula de inmunoglobulina completa ha o han sido reemplazados por o ha o han sido fijados a la misma por un enlace peptídico, una proteína no inmunoglobulina funcional tal como una enzima o molécula de toxina.

10 Alternativamente, se prefiere que la molécula de anticuerpo de la presente invención sea un fragmento Fab modificado, en donde la modificación consiste en la adición al extremo C terminal de su cadena pesada de uno o más aminoácidos para permitir la fijación de una molécula de efector o informador. Preferiblemente, los aminoácidos adicionales forman una región de bisagra modificada que contiene uno o dos residuos cisteína a los que se puede fijar la molécula de efector o informador.

15 También se proporciona una molécula de anticuerpo neutralizante de acuerdo con la presente invención que tiene una molécula de efector o una molécula de informador fijada a la misma. Moléculas de efector o informador incluyen una molécula tal como un agente citotóxico, un radionucleido o un resto de fármaco. Otras moléculas que pueden estar fijadas incluyen una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina difteria, una proteína

20 tal como factor de necrosis tumoral, α -interferón, β -interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador de plasminógeno tisular, un agente trombótico o un agente anti-angiogénico, p. ej., angioestatina o endostatina, o un modificador de la respuesta biológica tal como una linfoquina, interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-6 (IL-6), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF – siglas en inglés), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF – siglas en inglés), factor del crecimiento

25 nervioso (NGF – siglas en inglés) u otro factor de crecimiento.

Un grupo efector preferido es una molécula polímera que puede ser fijada al fragmento Fab modificado para aumentar su semivida in vivo.

30 La molécula de polímero puede, en general, ser un polímero sintético o un polímero que se produce de forma natural, por ejemplo un polímero de polialquileno, polialqueniлено o polioxialquileno de cadena lineal o ramificada, opcionalmente sustituido, o un polisacárido ramificado o no ramificado, p. ej. un homo- o hetero-polisacárido.

35 Sustituyentes opcionales particulares que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos arriba mencionados incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxi.

Ejemplos particulares de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol), poli(propilenglicol), poli(alcohol vinílico) de cadena lineal o ramificada, opcionalmente sustituidos, o derivados de los mismos, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido tal como metoxipoli(etilenglicol) o derivados del mismo.

40 Polímeros que se producen de forma natural particulares incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glicógeno o derivados de los mismos.

45 “Derivados” tal como se utiliza en esta memoria pretende incluir derivados reactivos, por ejemplo grupos reactivos tiol-selectivos tales como maleimidados y similares. El grupo reactivo puede estar enlazado al polímero directamente o a través de un segmento de enlazador. Se apreciará que el residuo de un grupo de este tipo formará parte, en algunos casos, del producto como el grupo enlazador entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

50 El tamaño del polímero puede variar según se desee, pero generalmente estará en un intervalo de pesos moleculares medios de 500 Da a 50.000 Da, preferiblemente de 5.000 a 40.000 Da y, más preferiblemente, de 25.000 a 40.000 Da. El tamaño del polímero puede seleccionarse, en particular, sobre la base del uso pretendido del producto. Así, por ejemplo, en los casos en los que el producto pretenda abandonar la circulación y penetrar en el tejido, por ejemplo para uso en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso utilizar un polímero de bajo peso molecular, por ejemplo con un peso molecular de alrededor de 5.000 Da. Para aplicaciones en las que el producto

55 permanezca en la circulación, puede ser ventajoso utilizar un polímero de mayor peso molecular, por ejemplo con un peso molecular en el intervalo de 25.000 Da a 40.000 Da.

Polímeros particularmente preferidos incluyen un polímero de polialquileno tal como poli(etilenglicol) o, en especial, un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado del mismo y, especialmente, con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 25.000 Da a aproximadamente 40.000 Da.

5 Cada una de las moléculas de polímero fijadas al fragmento de anticuerpo modificado puede estar enlazada covalentemente al átomo de azufre de un residuo cisteína localizado en el fragmento. El enlace covalente será generalmente un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono.

10 En los casos que se desee, el fragmento de anticuerpo puede tener una o más moléculas de efector o de informador fijadas al mismo. Las moléculas de efector o de informador pueden estar fijadas al fragmento de anticuerpo a través de cualquier cadena lateral de aminoácidos o grupo funcional de aminoácido terminal disponible, localizado en el fragmento, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, hidroxilo o carboxilo libre.

15 Un polímero activado puede utilizarse como el material de partida en la preparación de fragmentos de anticuerpo modificados con polímero según se describe arriba. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo tiol-reactivo tal como un ácido o éster α -halocarboxílico, p. ej. yodoacetamida, una imida, p. ej. maleimida, una vinil-sulfona o un disulfuro. Materiales de partida de este tipo se pueden obtener comercialmente (por ejemplo de Nektar, antiguamente Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, EE.UU), o se pueden preparar a partir de materiales de partida comercialmente disponibles utilizando procesos químicos convencionales. Moléculas de PEG particulares incluyen metoxi-PEG-amina de 20K (obtenible de Nektar, antiguamente Shearwater; Rapp Polymere; y SunBio) y M-PEG-SPA (obtenible de Nektar, antiguamente Shearwater).

25 En relación con la fijación de restos de poli(etilenglicol) (PEG), se hace referencia a "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (comp.), Plenum Press, Nueva York; "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications". 1997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (comps.), American Chemical Society, Washington DC y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences". 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York.

30 En los casos en los que se desee obtener un fragmento de anticuerpo enlazado a una molécula de efector o de informador, éste se puede preparar por procesos químicos o de ADN recombinante convencionales, en los que el fragmento de anticuerpo es enlazado, directamente o a través de un agente de acoplamiento, a la molécula de efector o de informador antes o después de la reacción con el polímero activado según sea apropiado. Procesos químicos particulares incluyen, por ejemplo, los descritos en los documentos WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195 y WO 89/01476. Alternativamente, en los casos en los que la molécula de efector o de informador sea una proteína o un polipéptido, el enlace se puede conseguir utilizando procesos de ADN recombinante, por ejemplo según se describe en los documentos WO 86/01533 y EP 0392745.

40 Preferiblemente, el fragmento Fab modificado de la presente invención está PEGilado (es decir, tiene PEG (poli(etilenglicol)) fijado covalentemente al mismo) de acuerdo con el método descrito en el documento EP-A-0948544. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab modificado y PEGilado tal como se muestra en la Figura 12. El fragmento Fab modificado tiene preferiblemente un grupo maleimida covalentemente enlazado a un grupo tiol sencillo en una región de bisagra modificada. Un residuo lisina está preferiblemente enlazado de forma covalente al grupo maleimida. A cada uno de los grupos amina en el residuo lisina está fijado preferiblemente un polímero de metoxipoli(etilenglicol) con un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. El peso molecular total de toda la molécula de efector es, por lo tanto, de aproximadamente 40.000 Da. Por consiguiente, se proporciona un anticuerpo neutralizante que tiene fijado a uno de los residuos cisteína en el extremo C-terminal de la cadena pesada un grupo lisil-maleimida o lisil-bis-maleimida, en donde cada uno de los grupos amino del residuo lisilo tiene enlazado covalentemente al mismo un residuo metoxipoli(etilenglicol) con un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. Por ejemplo, el peso molecular puede ser de 15.000-25.000 Da o, preferiblemente, de 18.000-22.000 Da, e incluso más preferiblemente de 19.000-21.000 Da.

55 En una realización preferida, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo neutralizante con especificidad para IL-1 β humana, que es un fragmento Fab modificado con una cadena pesada que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 15 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 20 y que tiene en el extremo C-terminal de su cadena pesada una región de bisagra modificada que contiene un residuo

cisteína al que se puede fijar una molécula de efector o de informador.

En otra realización preferida, se proporciona una molécula de anticuerpo neutralizante con especificidad para IL-1 β humana, que es un fragmento Fab modificado con una cadena pesada que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 15 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 20 y que tiene en el extremo C-terminal de su cadena pesada una región de bisagra modificada que contiene un residuo cisteína al que está fijada una molécula de efector o de informador.

Más preferiblemente, se proporciona una molécula de anticuerpo neutralizante con especificidad para IL-1 β humana, que es un fragmento Fab modificado con una cadena pesada que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 15 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 20, que tiene fijada al residuo cisteína en el extremo C-terminal de la cadena pesada un grupo lisil-maleimida, en donde cada uno de los grupos amino del residuo lisilo tiene enlazado covalentemente al mismo un residuo metoxipoli(etilenglicol) con un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da.

Incluso más preferiblemente, se proporciona una molécula de anticuerpo neutralizante, en donde su cadena pesada comprende o consiste en los residuos de aminoácidos números 22 a 251 de la secuencia dada en SEQ ID NO: 71, y en donde su cadena ligera comprende o consiste en los residuos de aminoácidos números 22 a 235 de la secuencia dada en SEQ ID NO: 70. Los residuos de aminoácidos números 1 a 21 de las secuencias dadas en SEQ ID NOs: 70 y 71 representan la secuencia conductora de *E. coli* que, de la manera más preferible, se escinde para dar una molécula de anticuerpo neutralizante de la presente invención.

Lo más preferiblemente, se proporciona una molécula de anticuerpo neutralizante, en donde su cadena pesada comprende o consiste en los residuos de aminoácidos números 22 a 251 de la secuencia dada en SEQ ID NO: 71, y en donde su cadena ligera comprende o consiste en los residuos de aminoácidos números 22 a 235 de la secuencia dada en SEQ ID NO: 70 que tiene fijada al residuo cisteína en el extremo C-terminal de la cadena pesada un grupo lisil-maleimida, en donde cada uno de los grupos amino del residuo lisilo tiene enlazado covalentemente al mismo un residuo metoxipoli(etilenglicol) con un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da.

También se proporciona una molécula de anticuerpo neutralizante con especificidad para IL-1 β humana, que se une al mismo epítipo que un anticuerpo neutralizante que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 20.

Los dominios de la región constante de la molécula de anticuerpo de la presente invención, si están presentes, se pueden seleccionar con respecto a la función propuesta de la molécula de anticuerpo y, en particular, las funciones de efector que puedan requerirse. Por ejemplo, los dominios de la región constante pueden ser los dominios IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humana. En particular, se pueden utilizar dominios de la región constante de IgG humana, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3 cuando la molécula de anticuerpo está destinada para usos terapéuticos y se requieren funciones de efector de anticuerpos. Alternativamente, los isotipos IgG2 e IgG4 se pueden utilizar cuando la molécula de anticuerpo está destinada para fines terapéuticos y no se requieren funciones de efector del anticuerpo, p. ej. para bloquear simplemente la actividad de IL-1 β .

La molécula de anticuerpo de la presente invención tiene preferiblemente una afinidad de unión de al menos $4,4 \times 10^{-10}$ M, más preferiblemente de al menos $3,2 \times 10^{-10}$ M.

La presente solicitud se refiere también a variantes de las moléculas de anticuerpo de la presente invención que tienen una afinidad mejorada por IL-1 β . Variantes de este tipo se pueden obtener mediante un cierto número de protocolos de maduración de afinidad, incluida la mutación de las CDRs (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), intercambio de la cadena (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), uso de cepas de mutador de *E. coli* (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), intercambio de ADN (Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), expresión del fago (Thompson et al., J. Mol. Biol. 256, 77-88, 1996) y PCR sexual (Cramer et al., Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan *et al.* (*supra*) comentan estos métodos de maduración de afinidad.

La presente invención proporciona también una secuencia de ADN aislada que codifica la o las cadenas pesada y/o ligera de la molécula de anticuerpo de la presente invención. Preferiblemente, la secuencia de ADN codifica la cadena pesada o la cadena ligera de la molécula de anticuerpo de la presente invención. La secuencia de ADN de la

presente invención puede comprender ADN sintético, por ejemplo producido por tratamiento químico, ADNc, ADN genómico o cualquier combinación de los mismos.

5 Secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención se pueden obtener por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, secuencias de ADN que codifican parte o la totalidad de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se pueden sintetizar según se desee a partir de las secuencias de ADN determinadas o sobre la base de las correspondientes secuencias de aminoácidos.

10 ADN que codifica las secuencias del marco del aceptor está ampliamente disponible para los expertos en la técnica y puede ser sintetizado fácilmente sobre la base de sus secuencias de aminoácidos conocidas.

15 Técnicas convencionales de biología molecular se pueden utilizar para preparar secuencias de ADN que codifiquen la molécula de anticuerpo de la presente invención. Secuencias de ADN deseadas se pueden sintetizar, completamente o en parte, utilizando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Según sea apropiado, se pueden utilizar técnicas de mutagénesis dirigida al lugar y de reacción en cadena de la polimerasa (PCR – siglas en inglés).

20 La presente invención se refiere también a un vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de ADN de la presente invención. Por consiguiente, se proporciona un vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de la presente invención. Preferiblemente, el vector de clonación o expresión comprende dos secuencias de ADN que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de la molécula de anticuerpo de la presente invención, respectivamente. Preferiblemente, un vector de acuerdo con la presente invención comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 69.

25 Métodos generales mediante los cuales se pueden construir los vectores, métodos de transfección y métodos de cultivo son bien conocidos por los expertos en la técnica. A este respecto, se hace referencia a “Current Protocols in Molecular Biology”, 1999, F. M. Ausubel (comp.), Wiley Interscience, Nueva York y al manual de Maniatis producido por Cold Spring Harbor Publishing.

30 También se proporciona una célula hospedante que comprende uno o más vectores de clonación o expresión que comprenden una o más secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de la presente invención. Cualquier sistema de célula hospedante/vector adecuado puede utilizarse para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Se pueden utilizar sistemas bacterianos, por ejemplo *E. coli* y otros sistemas microbianos, o también se pueden utilizar sistemas de expresión de células hospedantes eucarióticas, por ejemplo de mamíferos. Células hospedantes de mamíferos adecuadas incluyen CHO, células de mieloma o de hibridoma.

35 La presente invención proporciona también un procedimiento para la producción de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención, que comprende cultivar una célula hospedante que contiene un vector de la presente invención bajo condiciones adecuadas para conducir la expresión de la proteína a partir de ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente invención, y aislar la molécula de anticuerpo.

40 Para la preparación de productos que comprendan tanto cadenas pesadas como ligeras, la línea de células se puede transfectar con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Alternativamente, se puede utilizar un solo vector, incluyendo el vector secuencias que codifican polipéptidos de cadena ligera y de cadena pesada.

45 Dado que los anticuerpos de la presente invención son útiles en el tratamiento y/o profilaxis de una afección patológica, la presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende una molécula de anticuerpo de la presente invención en combinación con uno o más de un excipiente, diluyente o soporte farmacéuticamente aceptable. Por consiguiente, se proporciona el uso de un anticuerpo de la invención para la fabricación de un medicamento. La composición será suministrada habitualmente como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un soporte farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender, adicionalmente, un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

50 Se proporciona, además un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico

que comprende añadir y mezclar la molécula de anticuerpo de la presente invención junto con uno o más de un excipiente, diluyente o soporte farmacéuticamente aceptable.

5 La molécula de anticuerpo puede ser el único ingrediente activo en la composición farmacéutica o de diagnóstico, o puede estar acompañada por otros ingredientes activos que incluyen otros ingredientes de anticuerpos, por ejemplo anticuerpos anti- células T, anti-IFN γ o anti-LPS, o ingredientes no de anticuerpo tales como xantinas.

10 Las composiciones farmacéuticas comprenden preferiblemente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" tal como se utiliza en esta memoria se refiere a una cantidad de un agente terapéutico, necesaria para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección fijada como objetivo, o para exhibir un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier anticuerpo, la cantidad terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente en ensayos de cultivos celulares o en modelos con animales, habitualmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo de animal puede también utilizarse para determinar el intervalo de concentraciones apropiado y la vía de administración. Información de este tipo puede
15 luego utilizarse para determinar dosis y vías útiles para la administración a seres humanos.

20 La cantidad terapéuticamente eficaz precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado patológico, de la salud general del sujeto, la edad, el peso y sexo del sujeto, la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración, la o las combinaciones de fármacos, las sensibilidades de reacción y la tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad se puede determinar mediante una experimentación rutinaria y se encuentra dentro del juicio del médico. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz será de 0,01 mg/kg a 50 mg/kg, preferiblemente de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg. Composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en formas de dosis unitaria que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis.

25 Las composiciones se pueden administrar individualmente a un paciente o se pueden administrar en combinación (p. ej. simultánea, secuencialmente o por separado) con otros agentes, fármacos u hormonas.

30 La dosis a la que se administra la molécula de anticuerpo de la presente invención depende de la naturaleza de la afección a tratar, del grado de inflamación presente y de si la molécula de anticuerpo está siendo utilizada profilácticamente o para tratar una afección existente.

35 La frecuencia de la dosis dependerá de la semivida de la molécula de anticuerpo y de la duración de su efecto. Si la molécula de anticuerpo tiene una semivida corta (p. ej. de 2 a 10 horas), puede ser necesario administrar una o más dosis al día. Alternativamente, si la molécula de anticuerpo tiene una semivida larga (p. ej. 2 a 15 días), puede ser sólo necesario administrar una dosificación una vez al día, una vez por semana o incluso una vez cada 1 ó 2 meses.

40 El soporte farmacéuticamente aceptable no debería por sí mismo inducir la producción de anticuerpos nocivos para el individuo que recibe la composición y no debería ser tóxico. Soportes adecuados pueden ser macromoléculas grandes, lentamente metabolizadas tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivas.

45 Se pueden utilizar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo sales de ácidos minerales tales como hidroclouros, hidrobromuros, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

50 Soportes farmacéuticamente aceptables en composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, en composiciones de este tipo pueden estar presentes agentes humectantes o emulsionantes o sustancias tamponadoras del pH. Soportes de este tipo permiten que las composiciones farmacéuticas sean formuladas en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, disoluciones y suspensiones, para ingestión por parte del paciente.

55 Formas preferidas de administración incluyen formas adecuadas para la administración por vía parenteral, p. ej. mediante inyección o infusión, por ejemplo mediante inyección en bolo o infusión continua. En los casos en los que el producto sea para inyección o infusión, éste puede adoptar la forma de una suspensión, disolución o emulsión en un vehículo oleoso o acuoso, y puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, la molécula de anticuerpo puede estar en forma

seca para la reconstitución antes del uso con un líquido estéril apropiado.

Una vez formuladas, las composiciones de acuerdo con la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Los sujetos a tratar pueden ser animales. Sin embargo, se prefiere que las composiciones estén destinadas a la administración a sujetos humanos.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar por cualquier número de vías que incluyen, pero no se limitan a las vías oral, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdermal, transcutánea (por ejemplo, véase el documento WO 98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. También se pueden utilizar hiposprays para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Típicamente, las composiciones terapéuticas se pueden preparar en forma de inyectables, ya sea como disoluciones o suspensiones líquidas. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para la disolución en o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección.

El suministro directo de las composiciones se conseguirá, generalmente, mediante inyección por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o se puede suministrar al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también se pueden administrar a una lesión. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis sencillo o un programa de dosis múltiple.

Se apreciará que el ingrediente activo en la composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, será susceptible a la degradación en el tracto gastrointestinal. Así, si la composición se ha de administrar por una vía que utilice el tracto gastrointestinal, la composición necesitará contener agentes que protejan al anticuerpo frente a la degradación, pero que liberen el anticuerpo una vez que haya sido absorbido a partir del tracto gastrointestinal.

Una discusión a fondo de soportes farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N. J. 1991).

También está previsto que el anticuerpo de la presente invención se administre mediante el uso de la terapia génica. Con el fin de conseguir esto, secuencias de ADN que codifican las cadenas pesada y ligera de la molécula de anticuerpo bajo el control de componentes de ADN apropiados se introducen en un paciente, de modo que las cadenas de anticuerpos se expresen a partir de las secuencias de ADN y se ensamblen *in situ*.

Se proporciona, además, una molécula de anticuerpo para uso en el control de la inflamación. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo se puede utilizar para reducir el proceso inflamatorio o para evitar el proceso inflamatorio.

También se proporciona la molécula de anticuerpo de la presente invención para el uso en el tratamiento o la profilaxis de una afección patológica que es mediada por IL-1 β o está asociada con un nivel incrementado de IL-1 β . Preferiblemente, la afección patológica se selecciona del grupo que consiste en infecciones (virales, bacterianas, fúngicas y parasitarias), choque endotóxico asociado con infección, artritis, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Crohn, enfermedad de Peyronie, enfermedad celíaca, enfermedad de la vesícula biliar, enfermedad pilonidal, peritonitis, meningoencefalitis, otras afecciones autoinmunes, pancreatitis, trauma (cirugía), enfermedad de injerto frente a hospedante, rechazo de trasplantes, cáncer (tanto tumores sólidos como melanomas, hepatoblastomas, sarcomas, carcinomas de células escamosas, cánceres de células de transición, cánceres de ovarios y malignidades hematológicas y, en particular, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, cáncer gástrico y cáncer de colon), enfermedades del corazón, incluidas enfermedades isquémicas tales como infarto de miocardio así como aterosclerosis, coagulación intravascular, resorción ósea, osteoporosis, periodontitis e hipoclorhidria.

La presente solicitud proporciona también una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención para uso en el tratamiento o la profilaxis del dolor.

La presente solicitud proporciona, además, el uso de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno patológico que es mediado por IL-1 β o está asociado con un nivel incrementado de IL-1 β .

La presente solicitud proporciona, además, el uso de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente

invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis del dolor.

5 Una molécula de anticuerpo de la presente invención se puede utilizar en cualquier terapia en la que se desee reducir los efectos de IL-1 β en el cuerpo humano o animal. IL-1 β puede estar circulando en el cuerpo o puede estar presente en un nivel indeseablemente elevado localizado en un sitio particular del cuerpo, por ejemplo un sitio de inflamación.

La molécula de anticuerpo de la presente invención se utiliza preferiblemente para el control de la inflamación.

10 La presente solicitud proporciona también un método para tratar sujetos humanos o animales que padecen o están en riesgo de padecer una afección mediada por IL-1 β , comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de la molécula de anticuerpo de la presente invención.

15 La molécula de anticuerpo de la presente invención se puede utilizar también en el diagnóstico, por ejemplo en el diagnóstico in vivo y la representación en imágenes de estados patológicos que implican IL-1 β .

La presente invención se describe, adicionalmente, a modo de ilustración sólo, en los siguientes ejemplos, que se refieren a las figuras que se acompañan, en las que:

20 La Figura 1a) muestra la secuencia de nucleótidos y aminoácidos (SEQ ID NOS: 1 y 3, respectivamente) de los dominios variables de la cadena pesada, y la Figura 1b) muestra la secuencia de nucleótidos y aminoácidos (SEQ ID NOS: 2 y 4, respectivamente) de los dominios variables de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal murino IC8.

25 La Figura 2 muestra los vectores MRR14 y pMRR10.

30 La Figura 3 muestra el diseño de injerto para las secuencias de la cadena pesada (Figura 3a; SEQ ID NOS: 11-15) y ligera (Figura 3b; SEQ ID NOS 16-20) de IC8. El símbolo (I) destaca las diferencias entre las secuencias donante:aceptor:marco injertado; las CDRs están subrayadas con una sola línea para las secuencias de IC8. Éstas son como se definen por Kabat, excepto CDR-H1 que comprende las definiciones tanto de Kabat como de Chothia. Las secuencias subrayadas con doble línea son residuos donantes retenidos en los injertos. Los residuos con asterisco (*) son comunes en las secuencias de la línea germinal humana subgrupo VH3, pero no están presentes en esta línea germinal particular – éstas no se consideran residuos de ratones, incluso a pesar de que están presentes en la secuencia donante original.

35 La Figura 4 muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los genes diseñados gH1 (Figura 4a) y gL1 (Figura 4b).

40 La Figura 5 muestra los oligonucleótidos que se utilizaron para la construcción de genes.

45 La Figura 6 muestra las casetes de oligonucleótidos que se utilizaron para injertos adicionales. Se muestran: la secuencia de cadena sentido de ICg8L2 (SEQ ID NO: 59), la secuencia de cadena inversa (SEQ ID NO: 72) y la correspondiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 60); y la secuencia de cadena sentido de IC8gL3 (SEQ ID NO: 61), la secuencia de cadena inversa (SEQ ID NO: 73) y la correspondiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 62); la secuencia de cadena sentido de IC8gH2 (SEQ ID NO: 63), la secuencia de cadena inversa (SEQ ID NO: 64) y la correspondiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 65), y la secuencia de cadena sentido de IC8gH3 (SEQ ID NO: 66), la secuencia de cadena inversa (SEQ ID NO: 67) y la correspondiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 68). Los residuos subrayados indican aminoácidos cambiados.

50 La Figura 7 muestra los resultados del ensayo de neutralización de IL-1 β con injertos de IC8.

La Figura 8 muestra un mapa del vector pTTOD(Fab').

55 La Figura 9 muestra las etapas 1-4 en la clonación de genes de la región V de IC8 en el vector intermedio pTTOD(Fab').

La Figura 10 muestra un mapa del vector pTTOD(gH3gL3 Fab' IGS-2).

5 La Figura 11 muestra las secuencias codificadora y flanqueante de pTTOD(gH3gL3 Fab' IGS-2); SEQ ID NO: 69.

10 La Figura 12 muestra la estructura de un fragmento Fab modificado derivado de un anticuerpo contra IL-1 β enlazado covalentemente a través de un residuo cisteína a un enlazador de lisilo-maleimida, en donde cada uno de los grupos amino en el residuo lisilo tiene covalentemente fijado al mismo un residuo metoxi PEG, en donde n es aproximadamente 420.

Manipulaciones de ADN y métodos generales

15 La cepa INV α F' de *E. coli* (Invitrogen) se utilizó para la transformación y el crecimiento rutinario del cultivo. Enzimas de restricción y modificación del ADN se obtuvieron de Roche Diagnostics Ltd. y New England Biolabs. Las preparaciones de los plásmidos se realizaron utilizando los kits de purificación Maxi Plasmid (QIAGEN, n° de catálogo 12165). Las reacciones de secuenciación del ADN se realizaron utilizando el kit de secuenciación del terminador ABI Prism Big Dye (n° de catálogo 4304149) y se realizaron en un secuenciador automatizado ABI 3100 (Applied Biosystems). Los datos se analizaron utilizando el programa AutoAssembler (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos se obtuvieron de OSWEL. La concentración de Fab' se determinó utilizando un ELISA de ensamblaje a Fab'.

Ejemplo 1: Clonación y expresión de genes de las regiones variables del anticuerpo monoclonal murino IC8

25 *Preparación de ARN total*

30 El hibridoma que expresa IC8 se generó por parte de Cistron utilizando una tecnología de hibridoma convencional después de la inmunización de ratones con la proteína IL-1 β humana. Después, el hibridoma se obtuvo por parte de Celltech R&D Limited. El ARN total se preparó a partir de células de hibridoma de IC8 utilizando kit de QIAGEN RNeasy (QIAGEN Ltd. n° de catálogo 74104). El ARN obtenido se transcribió de forma inversa en ADNc utilizando el kit de Clontech cDNA Advantage RT para PCR (n° de catálogo K1402).

Clonación por PCR de las regiones VH y VL de IC8

35 El ADNc preparado a partir de células de hibridoma se utilizó como el molde para PCR en una serie de reacciones diseñadas para amplificar las secuencias de la región V. Las reacciones utilizaban un conjunto de cebadores degenerados "directos", diseñados para reasociarse al ADN dentro de la secuencia de señal conservada, y un cebador inverso que se reasocia a ADN que codifica la unión marco 4/región constante. La PCR se realizó utilizando TaqPlusPrecision (Stratagene, n° de catálogo 600211) y una concentración 0,25 mM de dNTP. Los productos de la PCR resultantes se clonaron en vectores de secuenciación (kit de clonación de InVitrogen Zero Blunt TOPO PCR para la secuenciación, n° de catálogo K2875) y se determinó la secuencia de ADN. Se utilizó la secuenciación de la proteína N-terminal del anticuerpo IC8 purificado (procedente del hibridoma) para confirmar que las secuencias traducidas correspondían a la secuencia de proteínas observada. Las secuencias de la región V se muestran en la Figura 1 y en SEQ ID NOS: 1 a 4.

45 Los genes de la región V murinos se sub-clonaron después en los vectores de expresión pMRR10 y pMRR14 (Figura 2). Estos son vectores separados para la expresión de las cadenas ligera y pesada, respectivamente, y contienen ADN genómico que codifica genes de la región constante para la cadena ligera kappa humana y la cadena pesada gamma-4, respectivamente.

50 La molécula de anticuerpo IC8 doble quimérica cHcL se expresó mediante co-transfección transitoria de los vectores de expresión de la cadena pesada y ligera arriba descritos (pMRR10 y pMRR14 que contenían VL y VH de IC8, respectivamente) en células CHO-L761. Las transfecciones se realizaron utilizando el proceso de lipofectamina de acuerdo con las instrucciones del fabricante (In Vitrogen, n° de catálogo 18324).

55 **Ejemplo 2: Injerto en CDR de IC8**

Las CDRs de IC8 se injertaron a CDRs en marcos humanos con el fin de reducir la potencial inmunogenicidad y para facilitar la expresión de *E. coli*. Marcos de aceptor de la línea germinal humana se eligieron de los subgrupos VH3 y VK1. La Figura 3 muestra una alineación entre la secuencia de ratón donante y los marcos humanos aceptores. El marco del aceptor de la cadena pesada es la secuencia VH3-11 (DP-35) de la línea germinal humana, procediendo el marco 4 de esta porción de la línea germinal JH4 de la región JH humana. El marco del aceptor de la cadena ligera es la secuencia 012 (DPK9) de la línea germinal humana, procediendo el marco 4 de esta porción de la línea germinal JK1 de la región JK humana.

La alineación en la Figura 3 muestra que existen 13 diferencias de marco entre las cadenas pesadas del donante y del aceptor (excluyendo las CDRs). En cada una de estas posiciones se realizó un análisis del potencial de ese residuo para que contribuyera a la unión del antígeno, a través del contacto directo con el antígeno, a través de un papel en el empaquetamiento de la CDR o a través de la implicación en la interfaz VL/VH; si se consideró importante, se conservó el residuo del donante murino. La alineación de la cadena ligera muestra que existen 15 diferencias de marco entre las secuencias del donante y del aceptor (excluyendo las CDRs). Se analizó de nuevo el potencial del residuo murino para contribuir a la unión al antígeno. De esta manera, se diseñaron tres injertos VH y tres injertos VL. Estos se muestran también en la Figura 3 y corresponden a SEQ ID NO: 13 (gH1); SEQ ID NO: 14 (gH2), SEQ ID NO: 15 (gH3), SEQ ID NO: 18 (gL1), SEQ ID NO: 19 (gL2) y SEQ ID NO: 20 (gL3).

Ejemplo 3: Diseño y construcción de genes para secuencias injertadas

Se diseñaron genes para codificar las secuencias injertadas utilizando codones frecuentemente utilizados en *E. coli* y evitando codones "raros" de *E. coli* (Wada et al. 1991), Nucl. Acids. Res., 19, 1981-86). Se introdujeron sitios de restricción en la secuencia de ADN a intervalos para facilitar una manipulación genética adicional. La Figura 4 muestra el diseño de genes para gH1 y gL1, cuyas secuencias se dan en SEQ ID NOS: 21 y 22. Las correspondientes secuencias de aminoácidos se dan en SEQ ID NOS: 23 y 24, respectivamente.

Se utilizaron oligonucleótidos completamente solapantes para construir los genes que codifican gH1 y gL1 (Figura 5; SEQ ID NOS: 27-58). Los oligonucleótidos que codifican los genes diseñados se reasociaron juntos mediante mezclado a una concentración de 100 pmol/μl en tampón (TrisHCl 12,5 mM, pH 7,5, MgCl₂ 2,5 mM, NaCl 25 mM, ditioeritritol 0,25 mM) y calentando hasta 95°C durante 3 minutos en un bloque de PCR programado para el enfriamiento hasta 30°C a una tasa de -0,01°C cada 10 segundos. Se añadieron T4 ADN ligasa (5 U) y su tampón de reacción apropiado, y los oligonucleótidos se ligaron juntos mediante incubación a 25°C durante 1 hora. Los genes de las cadenas pesada y ligera ligados se amplificaron luego mediante PCR, después de la adición de un exceso de 10 veces de cebadores T1 (SEQ ID NO: 25) y B1 (SEQ ID NO: 26) "extremos". Para esta amplificación se utilizó una ADN polimerasa de lectura de prueba (Taq Plus Precision, Stratagene). Los productos de amplificación se extendieron en un gel de agarosa al 1,5%. Se aisló la banda de 400-450 y se purificó con gel y luego se clonó en el vector intermedio pCR4 blunt TOPO de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Esto creó los plásmidos intermedios pCR4(IC8gL1) y pCR4(IC8gH1). Después, estos plásmidos se utilizaron como moldes para crear las formas injertadas adicionales gL2, gL3, gH2 y gH3.

Se utilizó un método de reemplazo de la casete de oligonucleótidos para crear los injertos humanizados gL2 y gL3. La Figura 6 muestra el diseño de las casetes de oligonucleótidos. Para construir cada una de las variantes, el vector pCR4(IC8gL1) se cortó con las enzimas de restricción KpnI y NheI. El fragmento de vector grande resultante se purificó en gel de agarosa y se utilizó en ligamiento con la casete de oligonucleótidos. Los pares de oligonucleótidos se reasociaron juntos mezclando a una concentración de 0,5 pmol/μl en un volumen de 200 μl de tampón (TrisHCl 12,5 mM, pH 7,5, MgCl₂ 2,5 mM, NaCl 25 mM, ditioeritritol 0,25 mM) y calentando hasta 95°C durante 3 minutos en un baño de agua (volumen, 500 ml) y luego dejando enfriar lentamente hasta la temperatura ambiente. La casete de oligonucleótidos reasociada se diluyó luego diez veces en agua antes del ligamiento en el vector apropiadamente cortado. Se utilizó la secuenciación de ADN para confirmar la secuencia correcta, creando los plásmidos pCR4(IC8gL2) y pCR4(IC8gL3).

La variante gH2 se construyó a partir de pCR4(IC8gH1) utilizando una estrategia de PCR. La cadena inversa de la casete mostrada en la Figura 6 (SEQ ID NO: 64) se utilizó como un cebador inverso en la PCR utilizando un cebador directo 5' específico para el vector para generar un producto que representa la secuencia de gH2 parcial. Ésta se digirió con las enzimas de restricción HindIII y BspEI y luego se clonó en pCR4(IC8gH1) restringido con HindIII-BspEI

para crear pCR4(IC8gH2).

La variante gH3 se construyó utilizando una estrategia de PCR diferente. Los dos oligonucleótidos gH3 mostrados en la figura 6 se utilizaron en reacciones de PCR separadas: la cadena sentido (SEQ ID NO: 66) en calidad de un cebador directo utilizando un cebador inverso 3' específico para el vector, y la cadena sin sentido (SEQ ID NO: 67) como un cebador inverso utilizando un cebador directo 5' específico para el vector. En ambos casos, el molde era pCR4(IC8gH1). Los dos productos de amplificación resultantes se aislaron y purificaron, luego se añadieron juntos con los dos cebadores 5' y 3' específicos para el vector y se ciclaron a través de amplificaciones adicionales por PCR para generar un producto gH3 de longitud completa. Éste se digirió con HindIII y Apal y se insertó en pCR4(IC8gH1) restringido con HindIII-Apal para crear pCR4(IC8gH3). Todas las variantes se confirmaron mediante secuenciación del ADN.

Cada uno de los injertos de la cadena pesada se sub-clonó luego en el vector de expresión pMRR14 como fragmentos HindIII-Apal. Cada uno de los 3 injertos de cadena ligera se sub-clonó en el vector de expresión de la cadena ligera pMRR10 como fragmentos Sful-BsiWI.

Selección de la variante injertada óptima

Los anticuerpos injertados se expresaron mediante co-transfección transitoria de los vectores de expresión de cadena pesada y ligera injertados descritos anteriormente (pMRR10 y pMRR14 que contenían gL1, gL2 y gL3 y gH1, gH2 y gH3 de IC8, respectivamente) en células CHO-L761. Las transfecciones se realizaron utilizando el proceso de lipofectamina de acuerdo con las instrucciones del fabricante (InVitrogen, n° de catálogo 18324).

Todas las combinaciones de la cadena injertada y de la cadena quimérica se expresaron y compararon frente al anticuerpo doble quimérico cHcL. La unión se confirmó en un ensayo BIAcore y en un ensayo de neutralización con IL-1 β .

Ensayo BIAcore

El formato de ensayo utilizaba anticuerpo anti-IL-1 β capturado por anti-hFc con una titulación de IL-1 β humana recombinante en la fase de disolución. IgG anti-humana de ratón, específica para el fragmento Fc (Celltech) se inmovilizó sobre flowcell 2 de un CM5 Sensor Chip a través de una química de acoplamiento de la amina a un nivel de 12757RU. Una superficie de referencia bloqueada se preparó sobre flowcell 1 mediante activación con EDC/NHS y desactivación con etanolamina utilizando los mismos volúmenes que para flowcell 2. Como tampón de desarrollo se utilizó tampón HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005%, Biacore AB) y los ensayos se realizaron a 25°C. Anticuerpo anti- IL-1 β se hizo pasar sobre los flowcells 1 y 2 y se capturó en la superficie anti-hFc inmovilizada utilizando un caudal de 10 μ l/min. IL-1 β de 400-0 nM se inyectó sobre la superficie del anticuerpo anti- IL-1 β bloqueado y capturado utilizando un caudal de 30 μ l/min durante 3 min. La superficie anti-hFc se regeneró con una inyección de 30 μ l de HCl 40 mM. Los parámetros cinéticos se calcularon utilizando el software BIAevaluation 3.1.

Para el Fab' de gIC8, el formato de ensayo utilizaba anticuerpo anti-IL-1 β capturado por anti-hF(ab') $_2$ (en que "h" indica que es un F(ab') $_2$ humano) y luego se tituló por encima IL-1 β . IgG anti-humana de cabra Affinipure específica para el fragmento F(ab') $_2$ (Jackson ImmunoResearch, código 109-005-097) se inmovilizó sobre flowcell 2 de un CM5 Sensor Chip a través de química de acoplamiento de amina hasta un nivel de 13025RU. Una superficie de referencia bloqueada se preparó sobre flowcell 1 mediante activación con EDC/NHS y desactivación con etanolamina utilizando los mismos volúmenes que para flowcell 2. Como tampón de desarrollo se utilizó el tampón HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005%, Biacore AB) y los ensayos se realizaron a 25°C. Anticuerpo anti-IL-1 β se hizo pasar sobre los flowcells 1 y 2 y se capturó sobre la superficie anti-hF(ab') $_2$ inmovilizada utilizando un caudal de 10 μ l/min. IL-1 β (Strathmann) de 400-0 nM se inyectó sobre la superficie del anticuerpo anti IL-1 β bloqueado y capturado utilizando un caudal de 30 μ l/min durante 3 min. La superficie anti-hF(ab') $_2$ se regeneró con una inyección de 30 μ l de HCl 40 mM, seguido de una inyección de 15 μ l de NaOH 5 mM. Los parámetros cinéticos se calcularon utilizando el software BIAevaluation 3.1.

La Tabla 1 muestra un resumen de los datos de afinidad por el antígeno Biacore. Resulta claro que el injerto gH1, que tiene residuos donantes en las posiciones 44 y 89, tiene una mayor afinidad que gH2, el cual sólo tiene un residuo

donante en la posición 89. Por lo tanto, se rechazó el injerto gH2. Sorprendentemente, se observó una elevada afinidad en el injerto gH3 en el que solamente la posición 44 es un residuo del marco donante.

Tabla 1: Afinidad mediante BIAcore

Anti-IL-1β	K_D (nM)
mIC8	0,30
cHcL	0,38
gH1gL1	0,35
gH1gL2	0,34
gH1gL3	0,30
gH2gL1	1,27
gH2gL3	1,14
gH2gL3	1,07
gH3gL1	0,28
gH3gL2	0,32
gH3gL3	0,28
gH3gL3 Fab'	0,32

5

Ensayo de neutralización in vitro

10 Fibroblastos se hicieron crecer hasta una confluencia del 80% en placas de 96 pocillos. Los anticuerpos se titularon en diluciones semi-logarítmicas a partir de 1 μ g/ml y se añadió IL-1 β para proporcionar una concentración final de 20 pg/ml. Las placas se incubaron a la temperatura ambiente durante 30 min. El medio de cultivo se retiró de los cultivos de fibroblastos y se añadieron 100 μ l de una mezcla de anticuerpo/IL-1 β a los pocillos apropiados y se cultivaron durante una noche a 37°C. La cantidad de IL-6 producida en respuesta a IL-1 β se estimó después utilizando el kit DY206 Human IL-6 DuoSet de R&D Systems.

15 Los resultados del ensayo de neutralización se muestran en la Figura 7, en la que las formas injertadas del anticuerpo (excluido gH2) se comparan con el anticuerpo de ratón parental. Al igual que con los datos de afinidad BIAcore, existía una diferencia muy pequeña entre cualesquiera de los injertos remanentes. Por lo tanto, gL3gH3 se seleccionó como la variante con la actividad óptima y el número menor de residuos marco de ratón. Tal como se muestra en la Figura 3, la secuencia de gH3 tiene 1 residuo marco donante, mientras que la secuencia de gL3 tiene 3 residuos marcos donantes.

20

Ensayo de neutralización in vivo

25 Para determinar la eficacia de neutralización del gH3gL3Fab' in vivo, el gH3gL3Fab' se sometió ensayo en dos modelos de inflamación *in vivo*

gH3gL3Fab'-PEG (40K) intraperitoneal/hIL-1 β intraperitoneal en ratones

30 A ratones Balb/c machos (18-25 g) se les inyectó por vía intraperitoneal (i.p.) gH3gL3Fab'-PEG (40K) (100 μ l, en vehículo de PBS) o Fab'-PEG (40K) control (100 μ l, en vehículo PBS) 5 minutos antes de la inyección i.p. con hIL-1 β (150 ng/kg o vehículo (100 μ l de PBS). Al cabo de 120 minutos, se sacrificó a los ratones mediante dislocación cervical y se realizó un lavado peritoneal (3 ml de HBSS (sales equilibradas de Hanks) + BSA al 0,25%, HEPES 12 mM). Se realizó un recuento total de leucocitos utilizando un contador Coulter. Para la identificación de neutrófilos, 50 μ l del fluido de lavado peritoneal se tiñeron con una dilución 1:300 del anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD45-CyChrome y una dilución 1:300 de mAb anti-GR-1 marcado con ficoeritrina (anti-Ly6G/Ly6C) durante 20 min (4°C, en la oscuridad). Los leucocitos se lavaron una vez en HBSS (BSA al 0,25%, HEPES 12 mM), se resuspendieron en 300 μ l de HBSS (BSA al 0,25%, HEPES 12 mM) y se analizaron mediante citometría de flujo. Los neutrófilos se identificaron como CD45+GR-1^{HGH}. La concentración de proteína quimioattractante de monocitos murinos-1 (mMCP-1) en las muestras de lavado peritoneal se midió mediante ELISA sándwich de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BD Biosciences OPT-EIA mMCP-1).

40

gH3gL3Fab'-Peg(40K) intravenoso/hIL-1 β intravenoso en ratones

- 5 Ratones Balb/c machos (18-25 g) se anestesiaron con halotano y se les inyectó por vía intravenosa (i.v.) gH3gL3Fab'-PEG (40K) (100 µl, en vehículo de PBS) o Fab-PEG control (100 µl, en vehículo PBS) 15 minutos antes de la inyección i.v. con hIL-1β (37,5 ó 50 µg/kg) o vehículo (100µl de PBS). Después de 90 minutos, se tomó una muestra de sangre mediante punción cardiaca en heparina (20 100 U/ml) y el plasma se preparó mediante centrifugación (14.000 x g, 2 min, TA). Muestras de plasma se almacenaron a -20°C. Las muestras de plasma se sometieron a ensayo en cuanto a la interleuquina-6 murina (mIL-6) mediante ELISA sándwich de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BD Biosciences OPT-EIA-mIL-6).
- 10 Los resultados demuestran que el pre-tratamiento de ratones con gH3gL3Fab'-PEG (40 k) por vía i.p. era eficaz para reducir la acumulación de neutrófilos inducida por hIL-1β i.p. (Tabla 2) y la generación de mMCP-1 (Tabla 3). El pre-tratamiento de ratones con gH3gL3Fab'-PEG (40 K) por vía i.v. también era eficaz para reducir la generación de mIL-6 inducida por hIL-1β i. v. Datos procedentes de 3 experimentos separados se resumen en la Tabla 4.
- 15 No se observaron efectos de enfermedad en ninguna de las dosis utilizadas en ninguno de los modelos. Por lo tanto, se puede esperar que el anticuerpo gH3gL3Fab' pueda ser útil en el tratamiento de la inflamación y de otras enfermedades mediadas por IL-1β.

Tabla 2: Acumulación de neutrófilos

20

Dosis de hIL-1β i.p. (ng/kg)	gH3gL3Fab'-PEG(40K) DE ₅₀ (mg/kg)	Inhibición máx. (% , dosis, mg/kg)
150	0,02	96 (1)
150	0,02	97 (1)
150	0,03	95 (1)
150	0,06	86 (0,1)
150	0,03	89 (1)
150	0,03	98 (0,3)

Tabla 3: Generación de mMCP-1

25

Dosis de hIL-1β i.p. (ng/kg)	gH3gL3Fab'-PEG(40K) DE ₅₀ (mg/kg)	Inhibición máx. (% , dosis, mg/kg)
150	0,02	98 (1)
150	0,01	100 (1)
150	0,02	98 (1)
150	0,04	92 (1)
150	0,02	98 (1)
150	ND	99 (0,3)

Tabla 4

30

Dosis de hIL-1β i.v. (ng/kg)	gH3gL3Fab'-PEG(40K) DE ₅₀ (mg/kg)	Inhibición máx. (% , dosis, mg/kg)
50	1,88	75 (10)
37,5	5,39	81 (10)
37,5	2,95	86 (10)

Ejemplo 4: Clonación y expresión de fragmentos Fab'

Clonación de regiones V seleccionadas en el plásmido de expresión en Fab' de E. coli pTTOD(Fab')

- 35 En la Figura 8 se muestra el vector de expresión que contiene un Fab' irrelevante, denominado pTTOD(Fab'). El ADN que codifica tanto la cadena ligera como la cadena pesada está precedido por ADN que codifica la secuencia

señal OmpA de *E. coli* (Mowa NR, Nakamura K e Inouye M. Amino acid sequence of the signal peptide of ompA protein a major outer membrane protein of Escherichia coli. J Biol. Chem. 1980; 255(1): 27-9). Las regiones V de IC8 se clonaron en este vector, de modo que se mantiene esta secuencia señal, dirigiendo la translocación de las dos cadenas al periplasma de *E. coli*. El péptido señal se escinde tras la translocación, de modo que no forma parte de la secuencia Fab' del producto (nota: la secuencia del péptido señal OmpA son los residuos de aminoácidos 1 a 21 de la secuencia dada en SEQ ID NO: 70. El plásmido pTTOD(Fab') se digirió con enzimas de restricción EcoRV y BsiWI (BsiWI y SphI son iso-esquizómeros) para separar la secuencia VL irrelevante y se insertó la región gL3V de IC8 seguido de su aislamiento a partir de pMRR10(IC8gL3). Esto creó la clonación de pTTOD(IC8gL3) intermedio. Después pTTOD(IC8gL3) se escindió con BsiWI y ApaI y 2 fragmentos se insertaron en un ligamiento de 3 vías; un fragmento c-kappa/IGS (IGS-2 o IGS-3) y el fragmento IC8gH3 (véase la representación esquemática en la Figura 9). De esta manera, se construyeron las 2 variantes del vector pTTOD(IC8gL3gH3IGS-2) y pTTOD(IC8gL3gH3IGS-3). Éstas se encontraban solamente en la secuencia de nucleótidos entre los genes de las cadenas ligera y pesada; IGS-2 confiere un acoplamiento de translación muy estrecho entre los 2 genes, dando una rápida tasa de traducción de la cadena pesada, IGS-3 confiere una tasa más lenta de traducción de la cadena pesada (véase la solicitud de patente del Reino Unido nº 0129105).

Expresión de Fab' en E. coli en el fermentador

Los plásmidos pTTOD(IC8gL3gH3 IGS-2) y pTTOD(IC8gL3gH3 IGS-3) se transformaron en la cepa W3110 de *E. coli* utilizando protocolos estándares. El Fab' periplásmico de *E. coli* soluble se extrajo utilizando el tampón tris-EDTA a 50°C. Después de extracción y enfriamiento, se ajustó el pH del extracto y las células se separaron mediante centrifugación y filtración. La corriente de alimentación clarificada se diluyó con agua (aproximadamente 2 veces) con el fin de reducir la conductividad. Fab' se capturó utilizando cromatografía de intercambio de cationes (resina SP sepharose FF) y el Fab' unido se eluyó utilizando una etapa en NaCl. La corriente de producto eluida se concentró, se diafiltró en tampón tris utilizando ultrafiltración y se sometió a cromatografía de intercambio de aniones (resina Q Sepharose FF) en donde el Fab' estaba contenido en la fracción no unida. El Fab' purificado se concentró y diafiltró en tampón de reducción (mediante ultrafiltración), seguido de reducción utilizando 2-mercaptoetilamina para activar el tiol bisagra. El agente reductante se separa entonces mediante intercambio de tampón por ultrafiltración. La secuenciación N-terminal confirmó la secuencia correcta de aminoácidos y la escisión del conductor OmpA. Se comparó la expresión de Fab' por parte de estos dos plásmidos.

La Tabla 5 muestra una comparación de rendimientos de Fab' en el fermentador para las variantes IGS-2 e IGS-3. La construcción IGS-2 supera claramente a IGS-3 en cuanto a la productividad de Fab'. Por lo tanto, se seleccionó la variante IGS-2. El mapa de plásmido se muestra en la Figura 10. La Figura 11 muestra la secuencia codificadora y flanqueante de Fab' de pTTOD(gH3gL3Fab'IGS-2).

Tabla 5: Rendimientos de expresión en el fermentador; una comparación de rendimientos de Fab' periplásmico de gIC8 anti-IL-1 β

Fermentaciones	Fecha	Construcción	ELISA de fab' peri. (mg/l)	Proteína G A280 (mg/l)
FM264	25/09/01	gIC8IGS2	602	588
FM265	25/09/01	gIC8IGS2	742	533
FM266	25/09/01	gIC8IGS3	243	
FM267	25/09/01	gIC8IGS3	224	

Actividad de Fab' producido por E. coli

Algo del Fab' producido por *E. coli* purificado se analizó después en cuanto a la afinidad en el ensayo Biacore tal como se muestra en la Tabla 1. Como se puede observar, este material conserva eficazmente la actividad completa en este ensayo.

PEGilación del Fab

El Fab modificado y purificado se conjuga de manera específica para el lugar con una molécula ramificada de PEG. Esto se consigue mediante la activación de un solo residuo cisteína en una región bisagra truncada del Fab modificado, seguido de la reacción con (PEG)-lisil-maleimida, tal como se ha descrito previamente (A. P. Chapman

et al., Nature Biotechnology 17, 780-783, 1999). En la Figura 12 se representa una molécula PEGilada de la invención. El PEG utilizado era metoxi-PEG-amina 20 K (obtenible de Nektar, antiguamente Shearwater). El Fab'-PEG resultante se purificó mediante cromatografía de intercambio de cationes (SP sepharose HP) utilizando una elución de gradiente de NaCl lineal. Fab'-PEG purificado se concentró y formuló mediante ultrafiltración en acetato de sodio 50 mM + NaCl 125 mM, pH 5,5 para producir el anticuerpo neutralizante terapéutico de la invención.

Se entenderá, naturalmente, que la presente invención ha sido descrita a modo de ejemplo solamente, que no ha de considerarse de modo alguno limitante, y que las modificaciones de detalle pueden realizarse dentro del alcance de las reivindicaciones que figuran más adelante en esta memoria.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CELLTECH R&D LIMITED

<120> Un anticuerpo neutralizante con especificidad para IL-1β humana

<160> 75

<170> SeqWin99, versión 1.02

<210> 1

<211> 414

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223>

<220>

<221> Secuencia de nucleótidos VH de IC8

<400> 1

atggactttg	ggctcagctt	gattttcctt	gtccttactt	taaaagggtg	gcagtgtgat	60
gtgcagttgg	tggagtctgg	gggaggctta	gtgaagcctg	gagggtcctt	gaaactctcc	120
tgtgcagcct	ctggattcga	tttcagtagg	tatgacatgt	cttgggttcg	ccagactccg	180
gagaagaggc	tggagtgggt	cgcataatatt	agtagtggtg	gtggtagcac	ctactttcca	240
gacactgtga	agggccgatt	caccatctcc	agagacaatg	ccaagaacac	cctgtacctg	300
caaatgaaca	atctgcagtc	tgaggacaca	gccatgtttt	actgtgcaag	acagaacaag	360
aaattaacct	ggtttgatta	ctggggccag	gggactctgg	tcaactgtctc	ttca	414

<210> 2

<211> 384

<212> ADN

<213>

<220>

<221> Secuencia VL de IC8

<400> 2

atgagtgtgc	tcactcaggt	cctggcgctg	ctgctgctgt	ggcttgcagg	tgccagatgt	60
gacatccaga	tgactcagtc	tccagcctcc	ctatctgcat	ctgtgggaga	aactgtcacc	120
atcacatgtc	gaacaagtgg	gaatattcac	aattatttaa	catggatca	acagaatttg	180
ggaaaatctc	ctcagctcct	ggtctataat	gcaaaaacct	tagcagatgg	tgtgccatca	240
aggttcagtg	gcagtggatc	aggaacacaa	ttttctctca	cgatcaacag	cctgcagcct	300
gaagattttg	ggaattatta	ctgtcaacat	ttttggagtc	ttccattcac	gttcggctcg	360
gggacaaagt	tggaaataaa	acgt				384

ES 2 373 953 T3

<210> 3
 <211> 138
 <212> PRT
 <213>

5

<220>
 <221> Secuencia de proteínas VH de IC8
 <400> 3

Val Gln Cys Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe
 35 40 45
 Ser Arg Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Phe Pro
 65 70 75 80
 Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Gln Ser Glu Asp Thr Ala Met
 100 105 110
 Phe Tyr Cys Ala Arg Gln Asn Lys Lys Leu Thr Trp Phe Asp Tyr Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135

10

<210> 4
 <211> 128
 <212> PRT
 <213>

15

<220>
 <221> Secuencia de proteínas VL de IC8
 <400> 4

ES 2 373 953 T3

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Ala
 1 5 10 15
 Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 20 25 30
 Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gly Asn
 35 40 45
 Ile His Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Asn Leu Gly Lys Ser Pro
 50 55 60
 Gln Leu Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Thr Ile Asn
 85 90 95
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp
 100 105 110
 Ser Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

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

5

<220>
 <221> CDR1 de VH de IC8

10 <400> 5

Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr Asp Met Ser
 1 5 10

<210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213>

15

<220>
 <221> CDR2 de VH de IC8

20

<400> 6
 Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Phe Pro Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 7

ES 2 373 953 T3

<211> 10
 <212> PRT
 <213>

5 <220><221> CDR3 de VH de IC8
 <400> 7

Gln Asn Lys Lys Leu Thr Trp Phe Asp Tyr
1 5 10

10
 <210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213>

15
 <220>
 <221> CDR1 de VL de IC8
 <400> 8

Arg Thr Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu Thr
1 5 10

20
 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213>

25
 <220>
 <221> CDR2 de VL de IC8
 <400> 9

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp
1 5

30
 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>

35
 <220>
 <221> CDR3 de VL de IC8
 <400> 10

Gln His Phe Trp Ser Leu Pro Phe Thr
1 5

40
 <210> 11
 <211> 119
 <212> PRT
 <213>
 <220>

ES 2 373 953 T3

<221> diseño de injerto VH a IC8

<400> 11

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

5

<210> 12
 <211> 109
 <212> PRT
 <213>

10

<220>
 <221> diseño de injerto 3.11 (DP-35) a IC8

15

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

<213>

<220>

<221> diseño de injerto gH2 a IC8

5

<400> 14

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

<210> 15

10 <211> 119

<212> PRT

<213>

<220>

15 <221> diseño de injerto gH3 a IC8

<400> 15

ES 2 373 953 T3

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

<210> 16
 <211> 108
 <212> PRT
 <213>

5

<220>
 <221> diseño de injerto VL a IC8

10

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

<210> 17

ES 2 373 953 T3

<211> 106
 <212> PRT
 <213>

5 <220>
 <221> diseño de injerto 012 (DPK9) a IC8

<400> 17
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Phe
 85 90 95
 Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

10 100 105

<210> 18
 <211> 108
 <212> PRT
 <213>

15 <220>
 <221> diseño de injerto gL1 a IC8

20 <400> 18

ES 2 373 953 T3

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

<210> 19
 <211> 108
 5 <212> PRT
 <213>

<220>
 <221> diseño de injerto gL2 a IC8

10 <400> 19

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

15 <210> 20
 <211> 108

ES 2 373 953 T3

<212> PRT
<213>

<220>
5 <221> diseño de injerto gL3 a IC8

<400> 20

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

10 <210> 21
<211> 458
<212> ADN
<213>

15 <220>
<221> gH1 de IC8

<400> 21

gaataaaagc	ttgccgccac	catggacttt	gggctcagct	tgattttcct	tgtccttact	60
ttaaaagggtg	tgcagtgtga	ggtgcagctg	gtcagagtctg	gagggcgggt	tgtccagcct	120
ggagggagcc	tgcgtctctc	ttgtgcagca	agcggcttcg	acttttcccg	ttacgatatg	180
tcttgggtgc	ggcaggcacc	tgggaagcgc	ctggagtggg	tggcatacat	tagctccgga	240
ggcggctcta	catacttccc	ggacaccgtc	aagggccgtt	tcaccatttc	ccgggacaat	300
gcaaagaata	ccctttacct	ccagatgaac	tctctccgcg	cagaggacac	agcaatgtat	360
tactgtgcac	ggcagaacaa	gaaactgacc	tggtttgact	actggggaca	ggggaccctt	420
gtgacagtct	cctctgcttc	tacaaagggc	ccaagaaa			458

20

25 <210> 22
<211> 414
<212> ADN
<213>

<220>
<221> secuencia de nucleótidos de gL1 de IC8

ES 2 373 953 T3

<400> 22

```

ggatgattcg aagccgccac catgagtgtg ctcaactcagg tcctggcggt gctgctgctg 60
tggcttgacg gtgccagatg tgatatccag atgaccacaga gtccaagcag tctctccgcc 120
agcgtaggcg atcgtgtgac tattacctgt cgtaccagtg gcaacatcca taattacctg 180
acgtggtacc agcaaaaact gggcaaagcc cgcagctcc tggctctataa cgcgaaaacg 240
ctagcagacg gtgtgccaag ccgtttcagt ggcaaggcca gcggtactca gtttaccctc 300
acaatttcgt ctctccagcc ggaagatttc gcccaattact attgtcagca cttttggagc 360
ctgcctttca ccttcgggtca gggcactaaa gtagaaatca aacgtacggc gtgc 414
    
```

5 <210> 23
 <211> 144
 <212> PRT
 <213>

10 <220>
 <221> secuencia de aminoácidos de gH1 de IC8

```

<400> 23
Met Asp Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Thr Leu Lys Gly
1          5          10          15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
          20          25          30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe
          35          40          45

Ser Arg Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu
50          55          60

Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Phe Pro
65          70          75          80

Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
          85          90          95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met
          100          105          110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Asn Lys Lys Leu Thr Trp Phe Asp Tyr Trp
          115          120          125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
130          135          140
    
```

15 <210> 24
 <211> 129
 <212> PRT
 <213>

20 <220>
 <221> secuencia de aminoácidos de gL1 de IC8

<400> 24

ES 2 373 953 T3

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Ala
 1 5 10 15
 Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gly Asn
 35 40 45
 Ile His Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Lys Ala Pro
 50 55 60
 Gln Leu Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp
 100 105 110
 Ser Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

Thr

- <210> 25
- <211> 21
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

- <220>
- 10 <221> cebador de oligonucleótidos

- <220>
- <221> cebador T1 extremo de gH1

- <400> 25
- 15 gaataaaagc ttgccccac c 21

- <210> 26
- <211> 22
- <212> ADN
- 20 <213> cebador de oligonucleótidos

- <220>
- <223> cebador B1 extremo de gH1

- <400> 26
- 25 ttcttgggc cctttgtaga ag 22

- <210> 27
- <211> 54

ES 2 373 953 T3

<212> ADN
 <213>

 <220>
 5 <221> gH1 F1 de IC8

 <400> 27
 atggacttg ggctcagctt gatttcctt gtccttactt taaaagggtg gcag 54

 10 <210> 28
 <211> 54
 <212> ADN
 <213>

 15 <220>
 <221> gH1 F2 de IC8

 <400> 28
 tgtgaggtag agctggtagc gctcggaggc gggcttgccc agcctggagg gage 54
 20
 <210> 29
 <211> 54
 <212> ADN
 <213>
 25
 <220>
 <221> gH1 F3 de IC8

 <400> 29
 30 ctgcgtctct ctgtgcagc aagcggcttc gactttccc gttacgatat gtcc 54

 <210> 30
 <211> 54
 <212> ADN
 35 <213>

 <220>
 <221> gH1 F4 de IC8

 <400> 30
 40 tgggtgcggc aggcacctgg gaagcgcctg gagtgggtgg catacattag ctcc 54

 <210> 31
 <211> 54
 45 <212> ADN
 <213>

 <220>
 <221> gH1 F5 de IC8

 <400> 31
 50 ggaggcggct ctacatactt cccggacacc gtcaagggcc gttcaccaat ttcc 54

 <210> 32
 55 <211> 54
 <212> ADN

ES 2 373 953 T3

<213>

<220>

5 <221> gH1 F6 de IC8

<400> 32
cgggacaatg caaagaatac cctttacctc cagatgaact ctctccgcgc agag 54

10 <210> 33
<211> 54
<212> ADN
<213>

<220>

15 <221> gH1 F7 de IC8

<400> 33
gacacagcaa tgtattactg tgcacggcag aacaagaaac tgacctggtt tgac 54

20 <210> 34
<211> 59
<212> ADN
<213>

<220>

25 <221> gH1 F8 de IC8

<400> 34
factggggac aggggaccct tgtgacagtc tcctctgctt ctacaaaggg cccaagaaa 59

30 <210> 35
<211> 58
<212> ADN
<213>

35 <220>

<221> gH1 R1 de IC8

<400> 35
40 cagaggagac tgcacaagg gtcccctgtc cccagtagtc aaaccaggtc agtttctt 58

<210> 36
<211> 54
<212> ADN

45 <213>

<220>

<221> gH1 R2 de IC8

50 <400> 36
gttctgccgt gcacagtaat acattgctgt gtcctctgcg cggagagagt tcat 54

<210> 37
<211> 54

55 <212> ADN
<213>

ES 2 373 953 T3

<220>
 <221> gH1 R3 de IC8
 5 <400> 37
 ctggaggtaa agggattct ttgcattgtc ccgggaaatg gtgaaacggc cctt 54
 <210> 38
 <211> 54
 10 <212> ADN
 <213>
 <220>
 <221> gH1 R4 de IC8
 15 <400> 38
 gacggtgtcc gggaagtatg tagagccgcc tccggagcta atgtatgcca ccca 54
 <210> 39
 20 <211> 54
 <212> ADN
 <213>
 <220>
 25 <221> gH1 R5 de IC8
 <400> 39
 ctccagggcg ttcccagggtg cctgccgcac ccaggacata tcgtaacggg aaaa 54
 30 <210> 40
 <211> 54
 <212> ADN
 <213>
 35 <220>
 <221> gH1 R6 de ICS
 <400> 40
 40 gtcgaagccg ctgctgcac aagagagacg caggctcct ccaggctgga caag 54
 <210> 41
 <211> 54
 <212> ADN
 <213>
 45 <220>
 <221> gH1 R7 de IC8
 <400> 41
 50 cccgcctcca gactcgacca gctgcacctc aactgcaca cctttaaag taag 54
 <210> 42
 <211> 54
 <212> ADN
 55 <213>

ES 2 373 953 T3

<220>
<221> gH1 R8 de IC8

<400> 42
5 gacaaggaaa atcaagctga gcccaaagtc catggtggcg gcaagctttt attc 54

<210> 43
<211> 20
<212> ADN
10 <213>

<220>
<221> cebador T1 extremo de gL1

15 <400> 43
ggatgattcg aagccgccac 20

<210> 44
<211> 21
20 <212> ADN
<213>

<220>
<221> cebador B1 extremo de gL1

25 <400> 44
gcacgccgta cgtttgattt c 21

<210> 45
30 <211> 55
<212> ADN
<213>

<220>
35 <221> gL1 F1 de IC8

<400> 45
catgagtgtg ctcaactcagg tctggcgtt gctgctgctg tggcttcag gtgcc 55

40 <210> 46
<211> 57
<212> ADN
<213>

45 <220>
<221> gL1 F2 de IC8

<400> 46
50 agatgtgata tccagatgac ccagagtcca agcagtctct ccgccagcgt aggcgat 57

<210> 47
<211> 57
<212> ADN
<213>

55 <220>

ES 2 373 953 T3

<221> gL1 F3 de IC8

<400> 47
 5 cgtgtgacta ttacctgtcg taccagtggc aacatccata attacctgac gtggtac 57

<210> 48
 <211> 57
 <212> ADN
 <213>

10 <220>

<221> gL1 F4 de IC8

<400> 48
 15 cagcaaaaac tgggcaaagc cccgcagctc ctggtctata acgcgaaaac gctagca 57

<210> 49
 <211> 57
 <212> ADN
 20 <213>

<220>

<221> gL1 F5 de IC8

<400> 49
 25 gacggtgtgc caagccggtt cagtggcagt ggcagcggta ctcagttac cctcaca 57

<210> 50
 <211> 57
 30 <212> ADN
 <213>

<220>

<221> gL1 F6 de IC8

<400> 50
 35 attcgtctc tccagccgga agattcgcc aattactatt gtcagcactt ttggagc 57

<210> 51
 <211> 54
 40 <212> ADN
 <213>

<220>

<221> gL1 F7 de IC8

<400> 51
 45 ctgccttca ccttcggtca gggcactaaa gtagaaatca aacgtacggc gtgc 54

<210> 52
 <211> 54
 50 <212> ADN
 <213>

55 <220>

<221> gL1 R1 de IC8

ES 2 373 953 T3

<400> 52
tactttagt ccctgaccga aggtgaaagg caggctcaa aagtgctgac aata 54

5 <210> 53
<211> 57
<212> ADN
<213>

10 <220>
<221> gL1 R2 de IC8

<400> 53
gtaattggcg aaatcttccg gctggagaga cgaaattgtg agggtaaact gagtacc 57

15 <210> 54
<211> 57
<212> ADN
<213>

20 <220>
<221> gL1 R3 de IC8

<400> 54
gctgccactg ccaactgaaac ggcttggcac accgtctgct agcgttttcg cgttata 57

25 <210> 55
<211> 57
<212> ADN
<213>

30 <220>
<221> gL1 R4 de IC8

35 <400> 55
gaccaggagc tgcggggctt tgcccagttt ttgctgttac cacgtcaggt aattatg 57

40 <210> 56
<211> 57
<212> ADN
<213>

<220>
<221> gL1 R5 de IC8

45 <400> 56
gatgttgcca ctggtacgac aggtaatagt cacacgatcg cctacgctgg cggagag 57

50 <210> 57
<211> 57
<212> ADN
<213>

<220>
55 <221> gL1 R6 de IC8

ES 2 373 953 T3

<400> 57
actgcttga cctgggtca tctggatc acatctggca cctgcaagcc acagcag 57

5 <210> 58
<211> 54
<212> ADN
<213>

10 <220>
<221> gL1 R7 de IC8

<400> 58
cagcaacgcc aggacctgag tgagcacact catggtggcg gcttcaatc atcc 54

15 <210> 59
<211> 51
<212> ADN
<213>

20 <220>
<221> secuencia gL2 de IC8

<400> 59
cagcaaaaac cgggcaaagc cccgcagctc ctggtctata acgcgaaaac g 51

25 <210> 60
<211> 21
<212> PRT
<213>

30 <220>
<221> secuencia gL2 de IC8

<400> 60
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Gln Leu Leu Val Tyr Asn
1 5 10 15

Ala Lys Thr Leu Ala
20

35 <210> 61
<211> 51
<212> ADN
<213>

40 <220>
<221> secuencia gL3 de IC8

<400> 61
cagcaaaaac cgggcaaagc cccgcagctc ctgatctata acgcgaaaac g 51

45 <210> 62
<211> 21
<212> PRT
<213>

50

ES 2 373 953 T3

<220>
 <221> secuencia gL3 de IC8

<400> 62
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Asn
 1 5 10 15

Ala Lys Thr Leu Ala
 20

5
 <210> 63
 <211> 48
 <212> ADN
 <213>

10
 <220>
 <221> secuencia gH2 de IC8

<400> 63
 15 cctgggaagg gcctggagtg ggtggcatac attagctccg gaggcggc 48

<210> 64
 <211> 48
 <212> ADN
 20 <213>

<220>
 <221> secuencia inversa gH2 de IC8

25 <400> 64
 ggacccttcc cggacctcac ccaccgtatg taatcgaggc ctccgccg 48

<210> 65
 <211> 16
 30 <212> PRT
 <213>

<220>
 <221> secuencia gH2 de IC8

35 <400> 65
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly
 1 5 10 15

<210> 66
 <211> 54
 40 <212> ADN
 <213>

<220>
 <221> secuencia gH3 de IC8

45 <400> 66
 gacacagcag tgattactg tgcacggcag aacaagaaac tgacctggtt tgac 54

<210> 67

ES 2 373 953 T3

<211> 54
<212> ADN
<213>
5 <220>
<221> secuencia inversa gH3 de IC8

<400> 67
ctgtgtcgtc acataatgac acgtgccgtc ttgtcttg actggaccaa actg 54
10
<210> 68
<211> 18
<212> PRT
<213>
15
<220>
<221> secuencia gH3 de IC8

<400> 68
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Asn Lys Lys Leu Thr Trp
1 5 10 15

Phe Asp
20

<210> 69
<211> 2050
<212> ADN
25 <213>

<220>
<221> secuencia codificadora y flanqueante de pTTOD(gH3gL3 Fab' IGS-2)
30 <400> 69

```

aattctcatg tttgacagct tatcatcgac tgcacgggtgc accaatgctt ctggcgtcag 60
gcagccatcg gaagctgtgg tatggctgtg caggtcgtaa atcactgcat aattcgtgtc 120
gctcaaggcg cactcccgtt ctggataatg ttttttgccg cgacatcata acggttctgg 180
caaatattct gaaatgagct gttgacaatt aatcatcggc tcgtataatg tgtggaattg 240
tgagcggata acaatttcac acaggaaaaca gcgatgagct tggctgcagg tcgagttcta 300
gataacgagg cgtaaaaaat gaaaaagaca gctatcgcaa ttgcagtggc cttggctggt 360
ttcgctaccg tagcgcgaag tgatatccag atgacccaga gtccaagcag tctctccgcc 420
agcgtaggcg atcgtgtgac tattacctgt cgtaccagtg gcaacatcca taattacctg 480
acgtggtacc agcaaaaacc gggcaaagcc ccgcagctcc tgatctataa cgcgaaaacg 540
ctagcagacg gtgtgccaaag ccgtttcagt ggcagtgcca gcggtactca gtttacctc 600
acaatttcgt ctctccagcc ggaagatttc gccattactc attgtcagca cttttggagc 660
ctgcctttca ccttcgggtc gggcactaaa gtgaaatca aacgtacggg agcggcccca 720
tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgtttg 780
tgctgtctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaaagt ggataacgcc 840
tcctcaatcg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac 900
agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc 960
tgccaagtca cccatcaggg cctgagctca ccagtaacaa aaagttttaa tagaggggag 1020
tgtaaaaatg aagaagactg ctatagcaat tgcagtggcg ctactgggtt tcgccaccgt 1080
ggcgcaagct gaggttcagc tggctcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggagggag 1140
cctgcgtctc tcttgtgcag caagcgggctt cgacttttcc cgttacgata tgtcctgggt 1200
gcggcaggca cctgggaagc gcctggagtg ggtggcatac attagctccg gaggcggctc 1260
tacatacttc ccggacaccg tcaagggccg tttaccattc tcccgggaca atgcaaagaa 1320
taccctttac ctccagatga actctctccg cgcagaggac acagcagtgt attactgtgc 1380
acggcagAAC aagaaactga cctggtttga ctactgggga caggggaccc ttgtgacagt 1440
ctcctctgct tctacaaagg gcccatcggg cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac 1500
ctctgggggc acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttcccgc aaccggtgac 1560
ggtgtcgtgg aactcaggcg cctgaccag ccgcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca 1620
gtcctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggggcac 1680
ccagacctac atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtcg acaagaaagt 1740
tgagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac atgcgcccg tcatgaggat ccaagcttgc 1800
ggcgcgcaat tcaactggcg tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcgttac 1860
ccaacttaat cgccttgcag cacatcccc tttcggcagc tcgcgtaata gcgaagaggc 1920
ccgcaccgat cgccttccc aacagttgcg cagcctgaat ggcgaaatgg gcctgatgcg 1980
gtattttctc cttacgcac tgtgcgggat ttcacaccgc ataaattccc tgttttggcg 2040
gatgagagaa 2050

```

<210> 70
 <211> 235
 5 <212> PRT
 <213>

<400> 70
 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Ala Gln Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 20 25 30
 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gly
 35 40 45
 Asn Ile His Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 50 55 60
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro
 65 70 75 80

ES 2 373 953 T3

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe
100 105 110

Trp Ser Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 71
<211> 251
5 <212> PRT
<213>

<400> 71

ES 2 373 953 T3

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30
 Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 35 40 45
 Asp Phe Ser Arg Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 50 55 60
 Arg Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Phe Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
 85 90 95
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Asn Lys Lys Leu Thr Trp Phe Asp
 115 120 125
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 225 230 235 240
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala
 245 250

<210> 72
 <211> 59
 <212> ADN
 <213>

5

ES 2 373 953 T3

<220>

<221> secuencia complementaria gL2 de IC8

<400> 72

5 ctagcgtttt cgcgttatag accaggagct gcggggcttt gcccggttt tgctggtac 59

<210> 73

<211> 59

<212> ADN

10 <213>

<220>

<221> secuencia complementaria gL3 de IC8

<400> 73

15 ctagcgtttt cgcgttatag atcaggagct gcggggcttt gcccggttt tgctggtac 59

<210> 74

<211> 15

20 <212> PRT

<213>

<400> 74

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

25 <210> 75

<211> 12

<212> PRT

<213>

30 <400> 75

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Iso Lys
1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un anticuerpo neutralizante con especificidad para IL-1 β humana, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 5 para CDR-H1, la secuencia dada en SEQ ID NO: 6 para CDR-H2 y la secuencia dada en SEQ ID NO: 7 para CDR-H3, y en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 8 para CDR-L1, la secuencia dada en SEQ ID NO: 9 para CDR-L2 y la secuencia dada en SEQ ID NO: 10 para CDR-L3.
- 10 2.- Un anticuerpo neutralizante de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo neutralizante es una molécula de anticuerpo injertada a CDR.
- 3.- La molécula de anticuerpo de la reivindicación 2, en donde el dominio variable comprende regiones marco del aceptor humano y CDRs de donantes no humanas.
- 15 4.- Un anticuerpo injertado a CDR de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde la cadena pesada comprende la secuencia gH3 dada en SEQ ID NO: 15.
- 5.- Un anticuerpo injertado a CDR de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde la cadena ligera comprende la secuencia gL3 dada en SEQ ID NO: 20.
- 20 6.- Un anticuerpo injertado a CDR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde la cadena pesada comprende la secuencia gH3 dada en SEQ ID NO: 15 y la cadena ligera comprende la secuencia gL3 dada en SEQ ID NO: 20.
- 25 7.- Un anticuerpo neutralizante de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 3 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 4.
- 8.- Una molécula de anticuerpo neutralizante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo completa con cadenas pesada y ligera de longitud completa.
- 30 9.- Una molécula de anticuerpo neutralizante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la molécula de anticuerpo es un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o scFv.
- 35 10.- Una molécula de anticuerpo neutralizante de acuerdo con la reivindicación 9, que tiene en el extremo C-terminal de su cadena pesada, una región de bisagra modificada que contiene uno o dos residuos cisteína a los que se puede fijar una molécula de efector o de informador.
- 40 11.- Una molécula de anticuerpo neutralizante de acuerdo con la reivindicación 10, que tiene una molécula de efector o una molécula de informador fijada a la misma.
- 12.- Una molécula de anticuerpo neutralizante de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la molécula de efector comprende uno o más polímeros.
- 45 13.- Una molécula de anticuerpo neutralizante de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el uno o más polímeros es/son un polímero de polialquileno, polialquilenilo o polioxialquileno de cadena lineal o ramificada, opcionalmente sustituido, o un polisacárido ramificado o no ramificado.
- 50 14.- Una molécula de anticuerpo neutralizante de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el uno o más polímeros es/son un metoxipoli(etilenglicol) o poli(etilenglicol).
- 55 15.- Una molécula de anticuerpo neutralizante de acuerdo con la reivindicación 11, que tiene fijada a uno de los residuos cisteína en el extremo C-terminal de la cadena pesada un grupo lisil-maleimida o lisil-bis-maleimida, en donde cada uno de los grupos amino del residuo lisilo tiene enlazado covalentemente al mismo un residuo metoxipoli(etilenglicol) con un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da.

- 5 16.- Una molécula de anticuerpo neutralizante de acuerdo con la reivindicación 1, que es un fragmento Fab modificado que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 15 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 20 y que tiene en el extremo C-terminal de su cadena pesada una región de bisagra modificada que contiene un residuo cisteína al que puede fijarse una molécula de efector o de informador.
- 10 17.- Una molécula de anticuerpo neutralizante de acuerdo con la reivindicación 1, que es un fragmento Fab modificado que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 15 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 20 y que tiene en el extremo C-terminal de su cadena pesada una región de bisagra modificada que contiene un residuo cisteína al que puede fijarse una molécula de efector o de informador.
- 15 18.- Una molécula de anticuerpo neutralizante de acuerdo con la reivindicación 17, en donde su cadena pesada comprende o consiste en los residuos de aminoácidos números 22 a 251 de la secuencia dada en SEQ ID NO: 71, y en donde su cadena ligera comprende o consiste en los residuos de aminoácidos números 22 a 235 de la secuencia dada en SEQ ID NO. 70.
- 20 19.- Una molécula de anticuerpo neutralizante de acuerdo con la reivindicación 17 o la reivindicación 18, que tiene fijado al residuo cisteína en el extremo C-terminal de la cadena pesada un grupo lisil-maleimida, en donde cada uno de los grupos amino del residuo lisilo tiene enlazado de forma covalente al mismo un residuo metoxipoli(etilenglicol) con un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da.
- 25 20.- Una secuencia de ADN aislada que codifica la o las cadenas pesada y/o ligera de una molécula de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.
- 30 21.- Un vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de ADN de acuerdo con la reivindicación 20.
- 35 22.- El vector de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el vector comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 69.
- 40 23.- Una célula hospedante que comprende uno o más vectores de clonación o expresión de acuerdo con las reivindicaciones 21 ó 22.
- 45 24.- Un procedimiento para la producción de la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, que comprende cultivar la célula hospedante de la reivindicación 23 y aislar la molécula de anticuerpo.
- 25.- Una composición farmacéutica que comprende una molécula de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en combinación con uno o más de un excipiente, diluyente o soporte farmacéuticamente aceptable.
- 26.- Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 25, que comprende adicionalmente otros ingredientes activos.

Figura 1a)

```

10          20          30          40          50          60
ATG GAC TTT GGG CTC AGC TTG ATT TTC CTT GTC CTT ACT TTA AAA GGT GTG CAG
TAC CTG AAA CCC GAG TCG AAC TAA AAG GAA CAG GAA TGA AAT TTT CCA CAC GTC
M D F G L S L I F L V L T L K G V Q>

          70          80          90          100          110
TGT GAT GTG CAG TTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTA GTG AAG CCT GGA GGG TCC
ACA CTA CAC GTC AAC CAC CTC AGA CCC CCT CCG AAT CAC TTC GGA CCT CCC AGG
C D V Q L V E S G G G L V K P G G S>

120          130          140          150          160          170
CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC GAT TTC AGT AGG TAT GAC ATG TCT
GAC TTT GAG AGG ACA CGT CGG AGA CCT AAG CTA AAG TCA TCC ATA CTG TAC AGA
L K L S C A A S G F D F S R Y D M S>

          180          190          200          210          220
TGG GTT CGC CAG ACT CCG GAG AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA TAT ATT AGT AGT
ACC CAA GCG GTC TGA GGC CTC TTC TCC GAC CTC ACC CAG CGT ATA TAA TCA TCA
W V R Q T P E K R L E W V A Y I S S>

230          240          250          260          270
GGT GGT GGT AGC ACC TAC TTT CCA GAC ACT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC
CCA CCA CCA TCG TGG ATG AAA GGT CTG TGA CAC TTC CCG GCT AAG TGG TAG AGG
G G G S T Y F P D T V K G R F T I S>

280          290          300          310          320          330
AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTG TAC CTG CAA ATG AAC AAT CTG CAG TCT GAG
TCT CTG TTA CGG TTC TTG TGG GAC ATG GAC GTT TAC TTG TTA GAC GTC AGA CTC
R D N A K N T L Y L Q M N N L Q S E>

          340          350          360          370          380
GAC ACA GCC ATG TTT TAC TGT GCA AGA CAG AAC AAG AAA TTA ACC TGG TTT GAT
CTG TGT CGG TAC AAA ATG ACA CGT TCT GTC TTG TTC TTT AAT TGG ACC AAA CTA
D T A M F Y C A R Q N K K L T W F D>

390          400          410          420
TAC TGG GGC CAG GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT TCA
ATG ACC CCG GTC CCC TGA GAC CAG TGA CAG AGA AGT
Y W G Q G T L V T V S S>

```

Figura 1b)

```

10      20      30      40      50      60
ATG AGT GTG CTC ACT CAG GTC CTG GCG TTG CTG CTG CTG TGG CTT GCA GGT GCC
TAC TCA CAC GAG TGA GTC CAG GAC CGC AAC GAC GAC GAC ACC GAA CGT CCA CGG
M S V L T Q V L A L L L L W L A G A>

      70      80      90      100      110
AGA TGT GAC ATC CAG ATG ACT CAG TCT CCA GCC TCC CTA TCT GCA TCT GTG GGA
TCT ACA CTG TAG GTC TAC TGA GTC AGA GGT CGG AGG GAT AGA CGT AGA CAC CCT
R C D I Q M T Q S P A S L S A S V G>

120      130      140      150      160      170
GAA ACT GTC ACC ATC ACA TGT CGA ACA AGT GGG AAT ATT CAC AAT TAT TTA ACA
CTT TGA CAG TGG TAG TGT ACA GCT TGT TCA CCC TTA TAA GTG TTA ATA AAT TGT
E T V T I T C R T S G N I H N Y L T>

      180      190      200      210      220
TGG TAT CAA CAG AAT TTG GGA AAA TCT CCT CAG CTC CTG GTC TAT AAT GCA AAA
ACC ATA GTT GTC TTA AAC CCT TTT AGA GGA GTC GAG GAC CAG ATA TTA CGT TTT
W Y Q Q N L G K S P Q L L V Y N A K>

      230      240      250      260      270
ACC TTA GCA GAT GGT GTG CCA TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGA ACA CAA
TGG AAT CGT CTA CCA CAC GGT AGT TCC AAG TCA CCG TCA CCT AGT CCT TGT GTT
T L A D G V P S R F S G S G S G T Q>

280      290      300      310      320      330
TTT TCT CTC ACG ATC AAC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GGG AAT TAT TAC TGT
AAA AGA GAG TGC TAG TTG TCG GAC GTC GGA CTT CTA AAA CCC TTA ATA ATG ACA
F S L T I N S L Q P E D F G N Y Y C>

      340      350      360      370      380
CAA CAT TTT TGG AGT CTT CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAG TTG GAA ATA
GTT GTA AAA ACC TCA GAA GGT AAG TGC AAG CCG AGC CCC TGT TTC AAC CTT TAT
Q H F W S L P F T F G S G T K L E I>

390
AAA CGT
TTT GCA
K R>

```

Figura 2

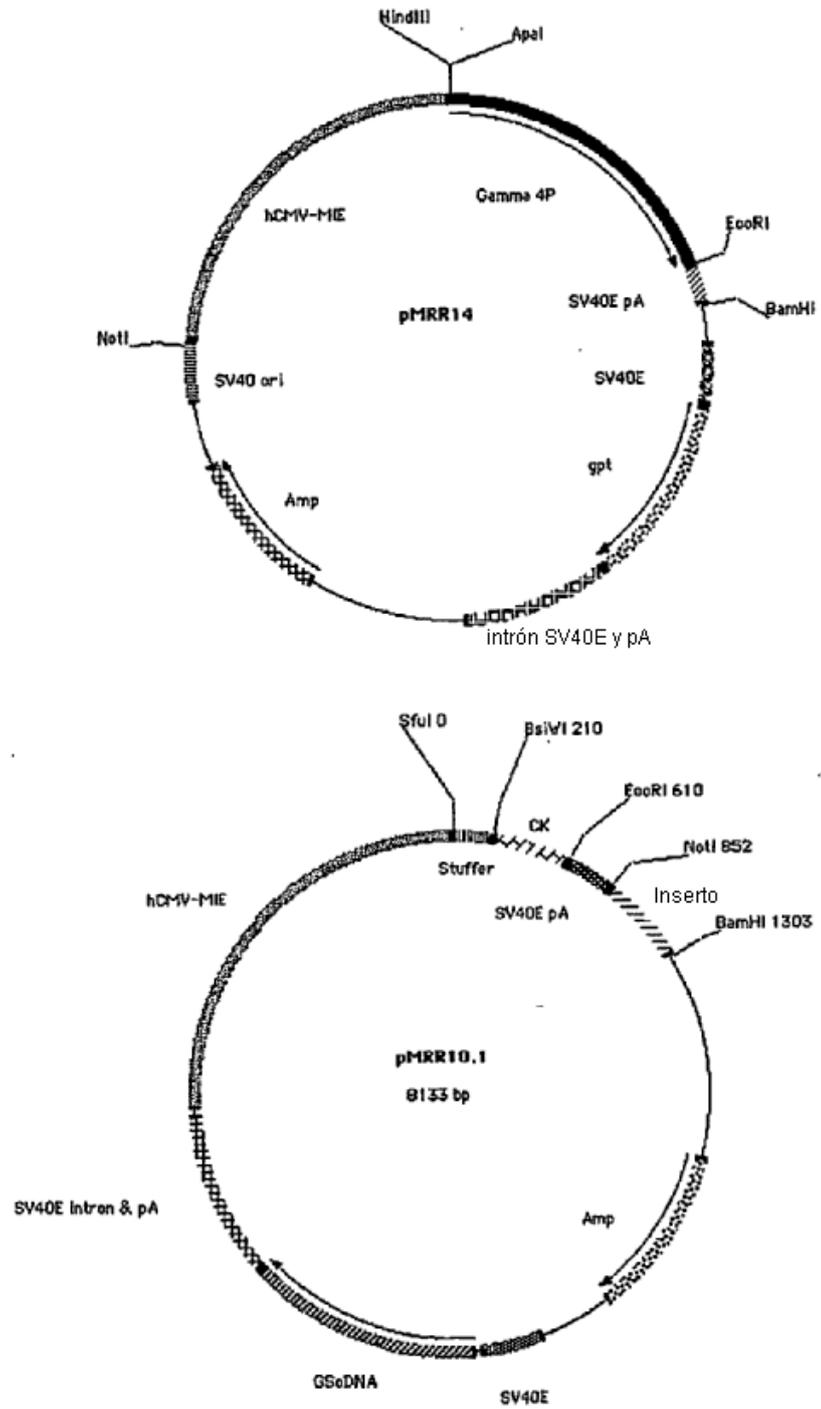


Figura 4

a)

```

      10      20      30      40      50
GAATAAAAGCTTGCCGCCACC ATG GAC TTT GGG CTC AGC TTG ATT TTC CTT GTC CTT
CTTATTTTCGAACGGCGGTGG TAC CTG AAA CCC GAG TCG AAC TAA AAG GAA CAG GAA
      M D F G L S L I F L V L>

      60      70      80      90      100      110
ACT TTA AAA GGT GTG CAG TGT GAG GTG CAG CTG GTC GAG TCT GGA GGC GGG CTT
TGA AAT TTT CCA CAC GTC ACA CTC CAC GTC GAC CAG CTC AGA CCT CCG CCC GAA
T L K G V Q C E V Q L V E S G G G L>

      120      130      140      150      160
GTC CAG CCT GGA GGG AGC CTG CGT CTC TCT TGT GCA GCA AGC GGC TTC GAC TTT
CAG GTC GGA CCT CCC TCG GAC GCA GAG AGA ACA CGT CGT TCG CCG AAG CTG AAA
V Q P G G S L R L S C A A S G F D F>

      170      180      190      200      210
TCC CGT TAC GAT ATG TCC TGG GTG CGG CAG GCA CCT GGG AAG CGC CTG GAG TGG
AGG GCA ATG CTA TAC AGG ACC CAC GCC GTC CGT GGA CCC TTC GCG GAC CTC ACC
S R Y D M S W V R Q A P G K R L E W>

220      230      240      250      260      270
GTG GCA TAC ATT AGC TCC GGA GGC GGC TCT ACA TAC TTC CCG GAC ACC GTC AAG
CAC CGT ATG TAA TCG AGG CCT CCG CCG AGA TGT ATG AAG GGC CTG TGG CAG TTC
V A Y I S S G G G S T Y F P D T V K>

      280      290      300      310      320
GGC CGT TTC ACC ATT TCC CGG GAC AAT GCA AAG AAT ACC CTT TAC CTC CAG ATG
CCG GCA AAG TGG TAA AGG GCC CTG TTA CGT TTC TTA TGG GAA ATG GAG GTC TAC
G R F T I S R D N A K N T L Y L Q M>

      330      340      350      360      370      380
AAC TCT CTC CGC GCA GAG GAC ACA GCA ATG TAT TAC TGT GCA CGG CAG AAC AAG
TTG AGA GAG GCG CGT CTC CTG TGT CGT TAC ATA ATG ACA CGT GCC GTC TTG TTC
N S L R A E D T A M Y Y C A R Q N K>

      390      400      410      420      430
AAA CTG ACC TGG TTT GAC TAC TGG GGA CAG GGG ACC CTT GTG ACA GTC TCC TCT
TTT GAC TGG ACC AAA CTG ATG ACC CCT GTC CCC TGG GAA CAC TGT CAG AGG AGA
K L T W F D Y W G Q G T L V T V S S>

      440      450
GCT TCT ACA AAG GGC CCA AGAAA
CGA AGA TGT TTC CCG GGT TCTTT
A S T K G P>

```

b)

```

      10      20      30      40      50
GGATGATTGCGAAGCCGCCACC ATG AGT GTG CTC ACT CAG GTC CTG GCG TTG CTG CTG
CCTACTAAGCTTCGGCGGTGG TAC TCA CAC GAG TGA GTC CAG GAC CGC AAC GAC GAC
      M   S   V   L   T   Q   V   L   A   L   L   L>

      60      70      80      90      100      110
CTG TGG CTT GCA GGT GCC AGA TGT GAT ATC CAG ATG ACC CAG AGT CCA AGC AGT
GAC ACC GAA CGT CCA CGG TCT ACA CTA TAG GTC TAC TGG GTC TCA GGT TCG TCA
      L   W   L   A   G   A   R   C   D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S>

      120      130      140      150      160
CTC TCC GCC AGC GTA GGC GAT CGT GTG ACT ATT ACC TGT CGT ACC AGT GGC AAC
GAG AGG CGG TCG CAT CCG CTA GCA CAC TGA TAA TGG ACA GCA TGG TCA CCG TTG
      L   S   A   S   V   G   D   R   V   T   I   T   C   R   T   S   G   N>

      170      180      190      200      210
ATC CAT AAT TAC CTG ACG TGG TAC CAG CAA AAA CTG GGC AAA GCC CCG CAG CTC
TAG GTA TTA ATG GAC TGC ACC ATG GTC GTT TTT GAC CCG TTT CGG GGC GTC GAG
      I   H   N   Y   L   T   W   Y   Q   Q   K   L   G   K   A   P   Q   L>

220      230      240      250      260      270
CTG GTC TAT AAC GCG AAA ACG CTA GCA GAC GGT GTG CCA AGC CGT TTC AGT GGC
GAC CAG ATA TTG CGC TTT TGC GAT CGT CTG CCA CAC GGT TCG GCA AAG TCA CCG
      L   V   Y   N   A   K   T   L   A   D   G   V   P   S   R   F   S   G>

      280      290      300      310      320
AGT GGC AGC GGT ACT CAG TTT ACC CTC ACA ATT TCG TCT CTC CAG CCG GAA GAT
TCA CCG TCG CCA TGA GTC AAA TGG GAG TGT TAA AGC AGA GAG GTC GGC CTT CTA
      S   G   S   G   T   Q   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D>

      330      340      350      360      370      380
TTC GCC AAT TAC TAT TGT CAG CAC TTT TGG AGC CTG CCT TTC ACC TTC GGT CAG
AAG CGG TTA ATG ATA ACA GTC GTG AAA ACC TCG GAC GGA AAG TGG AAG CCA GTC
      F   A   N   Y   Y   C   Q   H   F   W   S   L   P   F   T   F   G   Q>

      390      400      410
GGC ACT AAA GTA GAA ATC AAA CGT ACG GCGTGC
CCG TGA TTT CAT CTT TAG TTT GCA TGC CGCACG
      G   T   K   V   E   I   K   R   T>

```

Figura 5a)

cebador T1 extremo de gH1

GAATAAAAGCTTGCCGCCACC (SEQ ID NO:25)

cebador B1 extremo de gH1

TTTCTGGGCCCTTTGTAGAAG (SEQ ID NO:26)

IC8 gH1 F1

ATGGACTTTGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCCTTACTTTAAAAGGTGTGCAG (SEQ ID NO:27)

IC8gH1 F2

TGTGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCAGCCTGGAGGGAGC (SEQ ID NO:28)

IC8gH1 F3

CTGCGTCTCTTTGTGCAGCAAGCGGCTTCGACTTTCCCGTTACGATATGTCC (SEQ ID NO:29)

IC8gH1 F4

TGGGTGCGGCAGGCACCTGGGAAGCGCCTGGAGTGGGTGGCATAACATTAGCTCC (SEQ ID NO:30)

IC8gH1 F5

GGAGGCGGCTCTACATACTCCCGGACACCGTCAAGGGCCGTTTACCAATTTCC (SEQ ID NO:31)

IC8 gH1 F6

CGGGACAATGCAAAGAATACCCTTTACCTCCAGATGAACTCTCTCCGCGCAGAG (SEQ ID NO:32)

IC8 gH1 F7

GACACAGCAATGTATTACTGTGCACGGCAGAACAAGAACTGACCTGGTTTGAC (SEQ ID NO:33)

IC8gH1 F8

TACTGGGGACAGGGGACCCTTGTGACAGTCTCCTCTGCTTCTACAAAAGGGCCCAAGAAA (SEQ ID NO:34)

IC8gH1 R1

CAGAGGAGACTGTCACAAGGGTCCCCTGTCCCAGTAGTCAAACCAGGTGAGTTTCTT (SEQ ID NO:35)

IC8gH1 R2

GTTCTGCCGTGCACAGTAATACATTGCTGTGTCTCTGCGCGGAGAGAGTTCAT (SEQ ID NO:36)

IC8 gH1 R3

CTGGAGGTAAAGGGTATTCTTTGCATTGTCCCAGGAAATGGTGAAACGGCCCTT (SEQ ID NO:37)

IC8gH1 R4

GACGGTGTCCGGGAAGTATGTAGAGCCGCCTCCGGAGCTAATGTATGCCACCCA (SEQ ID NO:38)

IC8gH1 R5

CTCCAGGCGCTTCCCAGGTGCCTGCCGCACCCAGGACATATCGTAAACGGGAAAA (SEQ ID NO:39)

IC8 gH1 R6

GTGGAAGCCGCTTGCTGCACAAGAGAGACGCAGGCTCCCTCCAGGCTGGACAAG (SEQ ID NO:40)

IC8 gH1 R7

CCCGCTCCAGACTCGACCAGCTGCACCTCACACTGCACACCTTTTAAAGTAAG (SEQ ID NO:41)

IC8 gH1 R8

GACAAGGAAAATCAAGCTGAGCCCAAAGTCCATGGTGGCGGCAAGCTTTTATTC (SEQ ID NO:42)

Figura 5b)

cebador T1 extremo de gL1

GGATGATTCGAAGCCGCCAC (SEQ ID NO:43)

cebador B1 extremo de gL1

GCACGCCGTACGTTTGATTTC (SEQ ID NO:44)

IC8 gL1 F1

CATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGGCGTIGCTGCTGCTGTGGCTTGCAGGTGCC (SEQ ID NO:45)

IC8 gL1 F2

AGATGTGATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGGGAT (SEQ ID NO:46)

IC8 gL1 F3

CGTGTGACTATTACCTGTCTGACAGTGGCAACATCCATAATTACCTGACGTGGTAC (SEQ ID NO:47)

IC8 gL1 F4

CAGCAAAAAGTGGGCAAAGCCCCGCAGCTCCTGGTCTATAACGCGAAAACGCTAGCA (SEQ ID NO:48)

IC8 gL1 F5

GACGGTGTGCCAAGCCGTTTCAGTGGCAGTGGCAGCGGTACTCAGTTTACCCTCACA (SEQ ID NO:49)

IC8gL1 F6

ATTTGCTCTCTCCAGCCGGAAGATTTGCGCAATTAATAATTGTCAGCACTTTTGGAGC (SEQ ID NO:50)

IC8 gL1 F7

CTGCCTTTACCTTCGGTCAGGGCACTAAAGTAGAAATCAAACGTACGGCGTGC (SEQ ID NO:51)

IC8gL1 R1

TACTTTAGTGCCCTGACCGAAGGTGAAAGGCAGGCTCCAAAAGTGCTGACAATA (SEQ ID NO:52)

IC8 gL1 R2

GTAATTGGCGAAATCTTCCGGCTGGAGAGACGAAATTGTGAGGGTAAACTGAGTACC (SEQ ID NO:53)

IC8 gL1 R3

GCTGCCACTGCCACTGAAACGGCTTGGCACACCGTCTGCTAGCGTTTTTCGCGTTATA (SEQ ID NO:54)

IC8 gL1 R4

GACCAGGAGCTGCGGGGCTTTGCCAGTTTTTGGCTGGTACCACGTCAAGTAATTATG (SEQ ID NO:55)

IC8gL1 R5

GATGTTGCCACTGGTACGACAGGTAATAGTCACACGATCGCCTACGCTGGCGGAGAG (SEQ ID NO:56)

IC8gL1 R6

ACTGCTTGGACTCTGGGTCATCTGGATATCACATCTGGCACCTGCAAGCCACAGCAG (SEQ ID NO:57)

IC8 gL1 R7

CAGCAACGCCAGGACCTGAGTGAGCACACTCATGGTGGCGGCTTCGAATCATCC (SEQ ID NO:58)

Figura 6

```

CAG CAA AAA CCG GGC AAA GCC CCG CAG CTC CTG GTC TAT AAC GCG AAA ACG
C ATG GTC GTT TTT GGC CCG TTT CGG GGC GTC GAG GAC CAG ATA TTG CGC TTT TGC GAT C
W Y Q Q K E G K A P Q L L V Y N A K T L A>
KpnI
NheI

CAG CAA AAA CCG GGC AAA GCC CCG CAG CTC CTG ATC TAT AAC GCG AAA ACG
C ATG GTC GTT TTT GGC CCG TTT CGG GGC GTC GAG GAC TAG ATA TTG CGC TTT TGC GAT C
W Y Q Q K E G K A P Q L L I Y N A K T L A>
KpnI
NheI

CCT GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTG GCA TAC ATT AGC TCC GGA GGC GGC
GGA CCC TTC CCG GAC CTC ACC CAC CGT ATG TAA TCG AGG CCT CCG CCG
P G K G L E W V A Y I S S G G G>
BspEI

GAC ACA GCA GTG TAT TAC TGT GCA CGG CAG AAC AAG AAA CTG ACC TGG TTT GAC
CTG TGT CGT CAC ATA ATG ACA CGT GCC GTC TTG TTC TTT GAC TGG ACC AAA CTG
D T A V Y Y C A R Q N K K L T W F D>

```

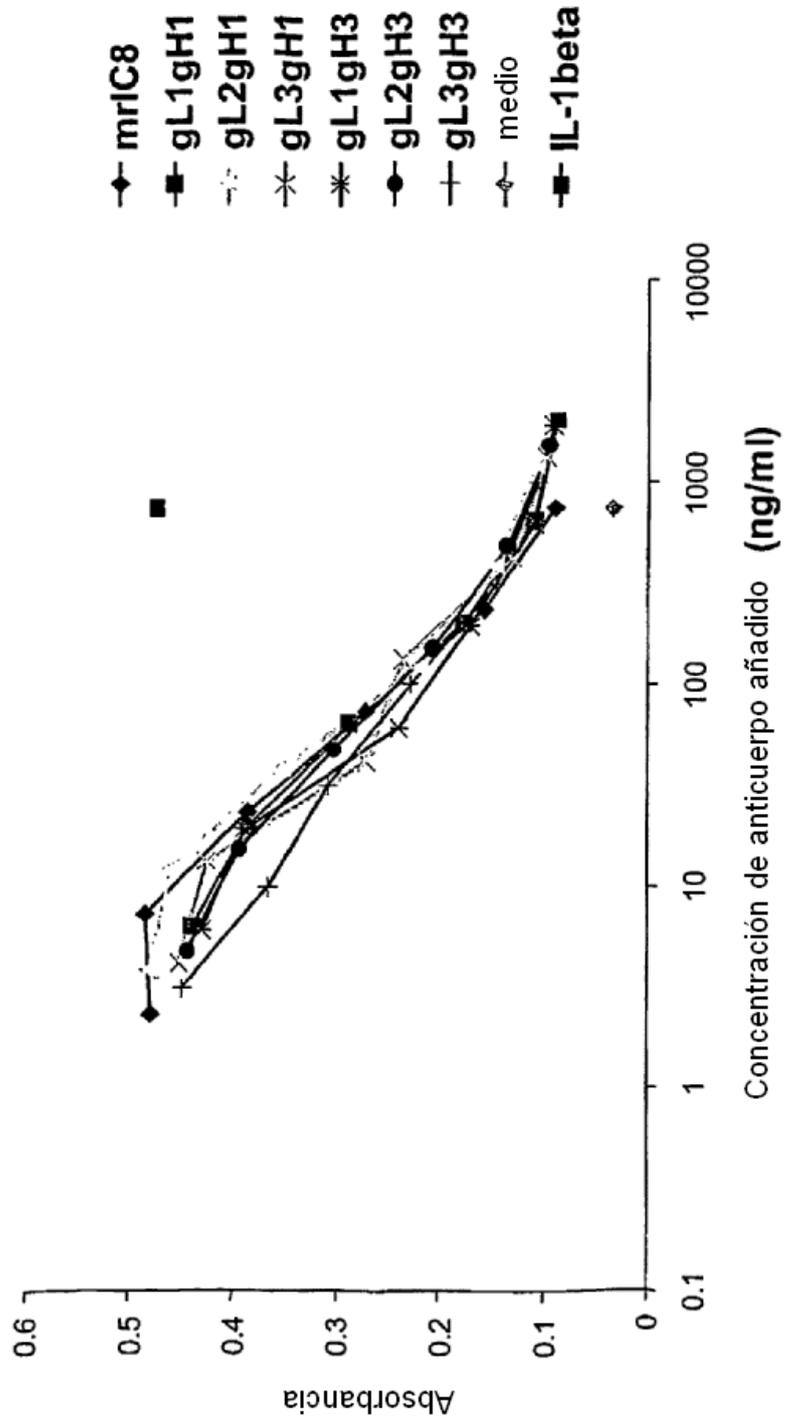


Figura 7

Figura 8

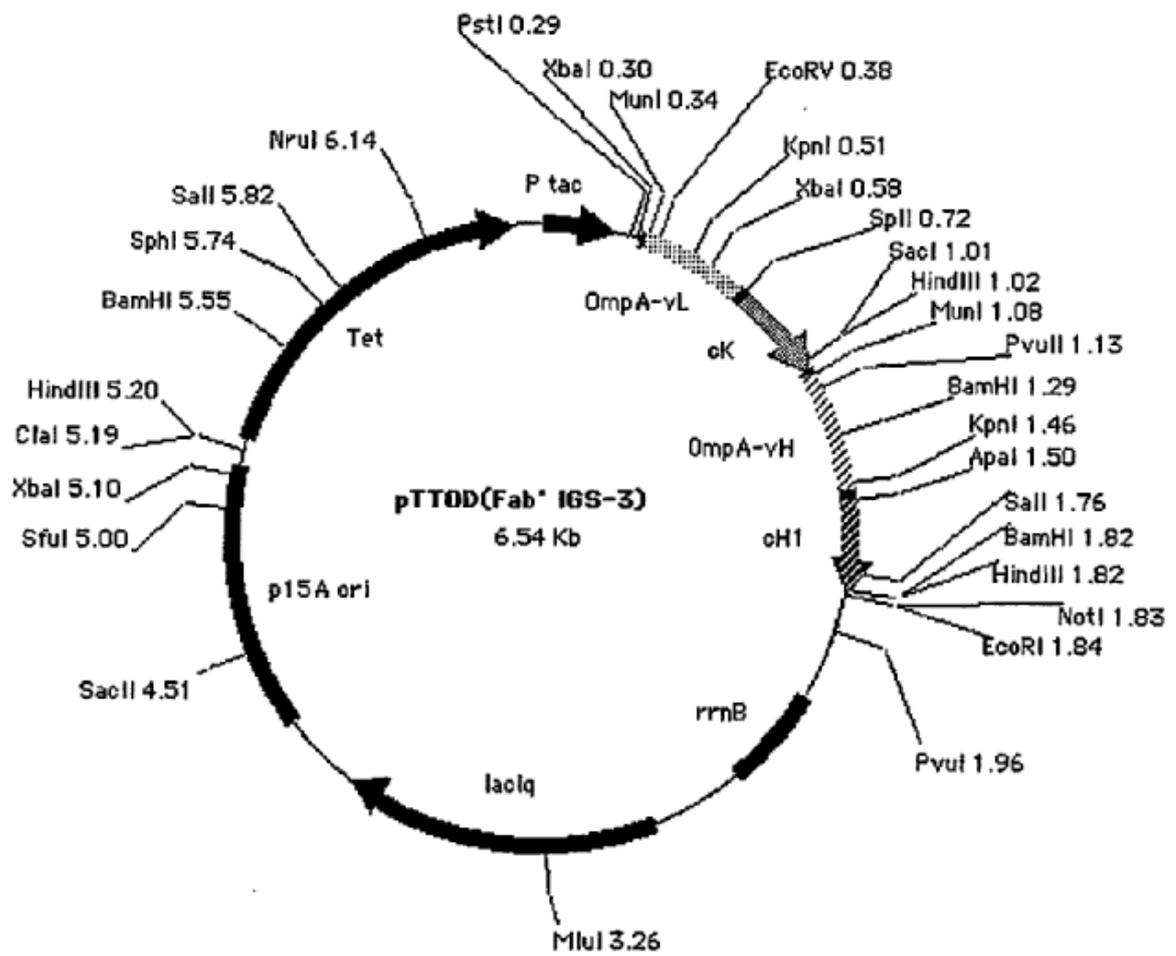


Figura 9

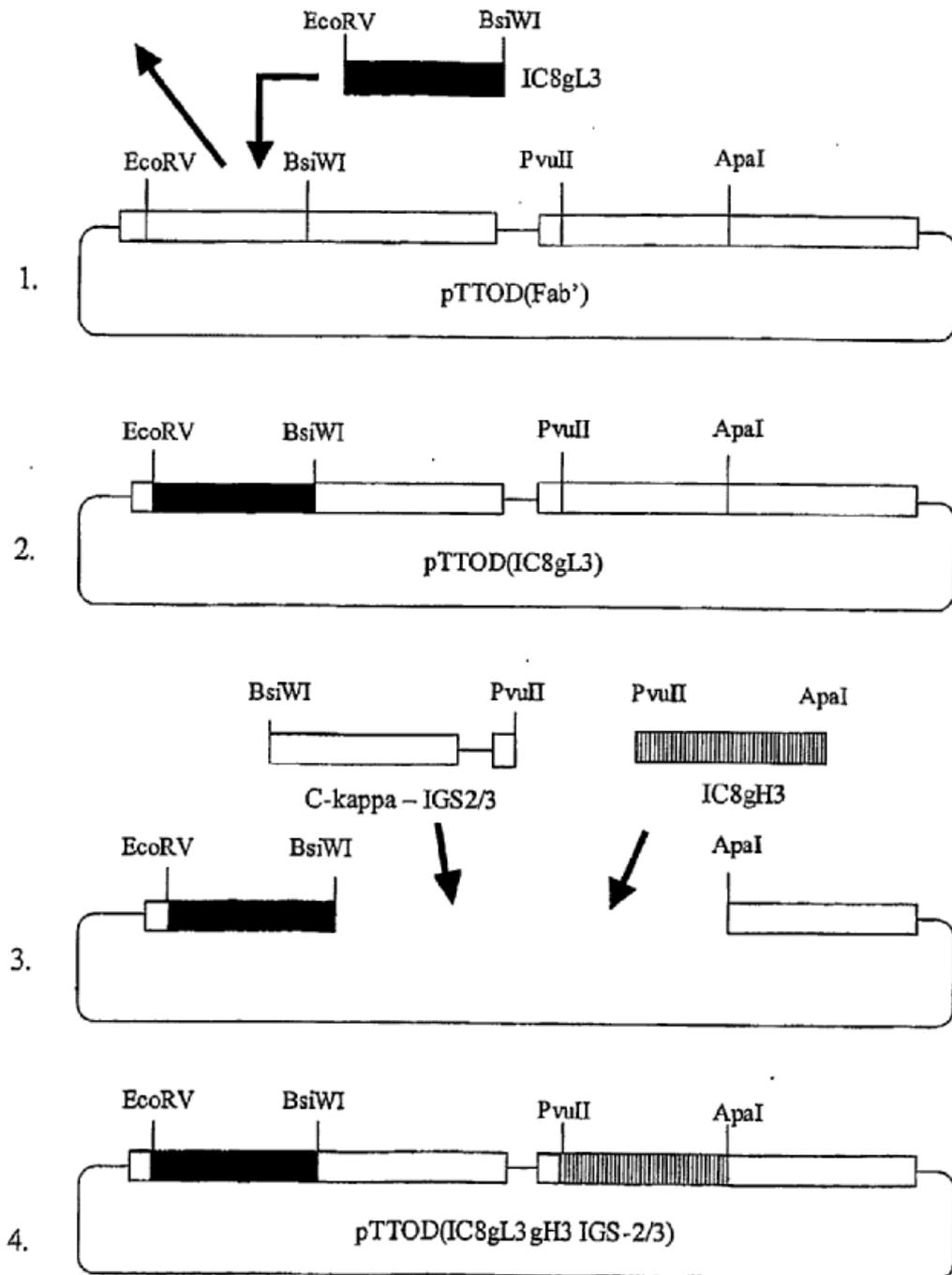


Figura 10

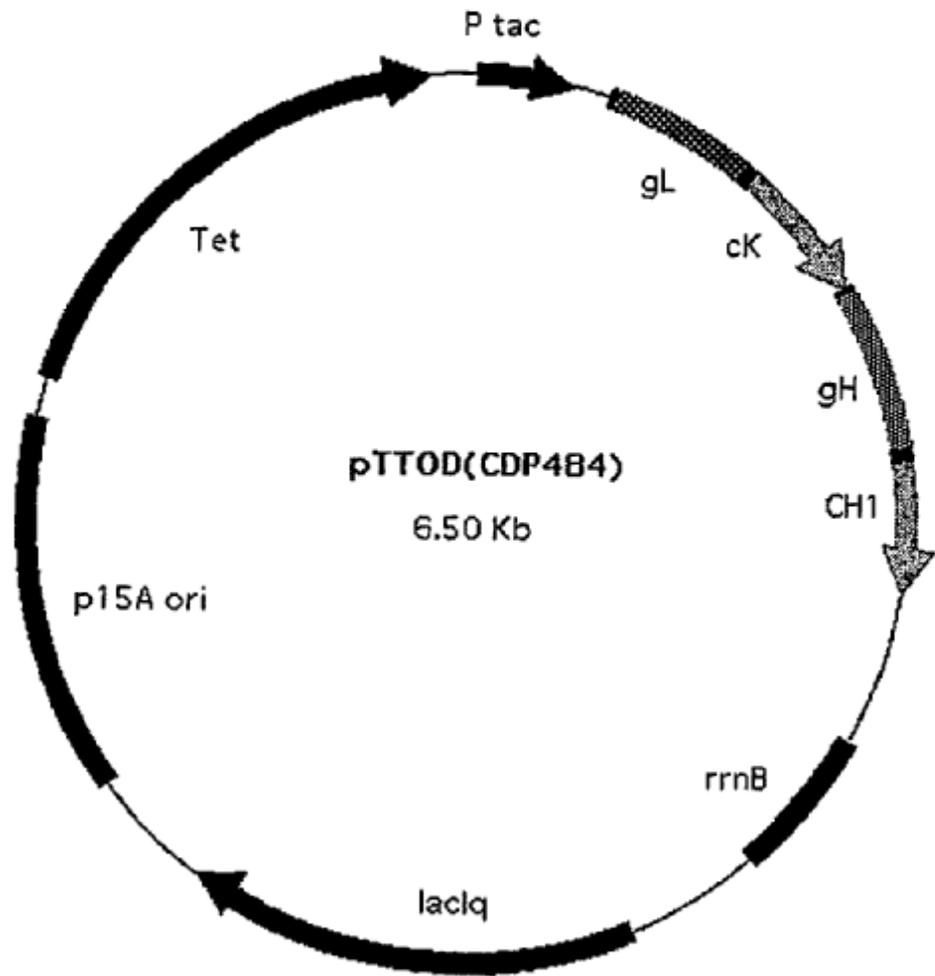


Figura 11

```

      10      20      30      40      50      60      70
AATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGACTGCACGGTGCACCAATGCTTCTGGCGTCAGGCAGCCATCG
TTAAGAGTACAAACTGTGCAATAGTAGCTGACGTGCCACGTGGTTACGAAGACCCGAGTCCGTCGGTAGC

      80      90      100      110      120      130      140
GAAGCTGTGGTATGGCTGTGCAGGTCGTAAATCACTGCATAAATCGTGTGCTCAAGGCAGCACTCCCGTT
CTTCGACACCATAACCGACACGTCCAGCATTAGTAGCTATTAAGCACAGCGAGTCCGCGTGAGGGCAA

      150      160      170      180      190      200      210
CTGGATAATGTTTTTTCGCGCCGACATCATACCGTTCTGGCAAATATTCTGAAATGAGCTGTTGACAATT
GACCTATTACAAAAACGCGGCTGTAGTATTGCCAAGACCGTTTATAAGACTTTACTCGACAACCTGTTAA

      220      230      240      250      260      270      280
AATCATCGGTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCGATGAGCT
TTAGTAGCCGAGCATATTACACACCTTAACACTCGCCTATTGTTAAAGTGTGTCCTTTGTCGCTACTCGA

      290      300      310      320      330      340
TGGCTGCAGGTCGAGTTCTAGATAACGAGGCGTAAAAA ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCA ATT
ACCGACGTCCAGCTCAAGATCTATTGCTCCGCATTTTT TAC TTT TTC TGT CGA TAG CGT TAA
                                     M K K T A I A I>

      350      360      370      380      390
GCA GTG GCC TTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAA GCT GAT ATC CAG ATG ACC
CGT CAC CGG AAC CGA CCA AAG CGA TGG CAT CGC GTT CGA CTA TAG GTC TAC TGG
A V A L A G F A T V A Q A D I Q M T>

      400      410      420      430      440      450
CAG AGT CCA AGC AGT CTC TCC GCC AGC GTA GGC GAT CGT GTG ACT ATT ACC TGT
GTC TCA GGT TCG TCA GAG AGG CCG TCG CAT CCG CTA GCA CAC TGA TAA TGG ACA
Q S P S S L S A S V G D R V T I T C>

      460      470      480      490      500
CGT ACC AGT GGC AAC ATC CAT AAT TAC CTG ACG TGG TAC CAG CAA AAA CCG GGC
GCA TGG TCA CCG TTG TAG GTA TTA ATG GAC TGC ACC ATG GTC GTT TTT GGC CCG
R T S G N I H N Y L T W Y Q Q K P G>

      510      520      530      540      550
AAA GCC CCG CAG CTC CTG ATC TAT AAC GCG AAA ACG CTA GCA GAC GGT GTG CCA
TTT CGG GGC GTC GAG GAC TAG ATA TTG CGC TTT TGC GAT CGT CTG CCA CAC GGT
K A P Q L L I Y N A K T L A D G V P>

560      570      580      590      600      610
AGC CGT TTC AGT GGC AGT GGC AGC GGT ACT CAG TTT ACC CTC ACA ATT TCG TCT
TCG GCA AAG TCA CCG TCA CCG TCG CCA TGA GTC AAA TGG GAG TGT TAA AGC AGA
S R F S G S G S G T Q F T L T I S S>

      620      630      640      650      660
CTC CAG CCG GAA GAT TTC GCC AAT TAC TAT TGT CAG CAC TTT TGG AGC CTG CCT
GAG GTC GGC CTT CTA AAG CCG TTA ATG ATA ACA GTC GTG AAA ACC TCG GAC GGA
L Q P E D F A N Y Y C Q H F W S L P>

      670      680      690      700      710      720
TTC ACC TTC GGT CAG GGC ACT AAA GTA GAA ATC AAA CGT ACG GTA GCG GCC CCA
AAG TGG AAG CCA GTC CCG TGA TTT CAT CTT TAG TTT GCA TGC CAT CGC CGG GGT
F T F G Q G T K V E I K R T V A A P>

```

ES 2 373 953 T3

730 740 750 760 770
 TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT
 AGA CAG AAG TAG AAG GGC GGT AGA CTA CTC GTC AAC TTT AGA CCT TGA CGG AGA
 S V F I F P P S D E Q L K S G T A S>

780 790 800 810 820
 GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG
 CAA CAC ACG GAC GAC TTA TTG AAG ATA GGG TCT CTC CGG TTT CAT GTC ACC TTC
 V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K>

830 840 850 860 870 880
 GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC
 CAC CTA TTG CGG GAG GTT AGC CCA TTG AGG GTC CTC TCA CAG TGT CTC GTC CTG
 V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D>

890 900 910 920 930
 AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC
 TCG TTC CTG TCG TGG ATG TCG GAG TCG TCG TGG GAC TGC GAC TCG TTT CGT CTG
 S K D S T Y S L S S T L T L S K A D>

940 950 960 970 980 990
 TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCA
 ATG CTC TTT GTG TTT CAG ATG CGG ACG CTT CAG TGG GTA GTC CCG GAC TCG AGT
 Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S>

1000 1010 1020
 CCA GTA ACA AAA AGT TTT AAT AGA GGG GAG TGT TAA
 GGT CAT TGT TTT TCA AAA TTA TCT CCC CTC ACA ATT
 P V T K S F N R G E C *>

1030 1040 1050 1060 1070
 A ATG AAG AAG ACT GCT ATA GCA ATT GCA GTG GCG CTA GCT GGT TTC GCC ACC
 T TAC TTC TTC TGA CGA TAT CGT TAA CGT CAC CGC GAT CGA CCA AAG CGG TGG
 M K K T A I A I A V A L A G F A T>

1080 1090 1100 1110 1120 1130
 GTG GCG CAA GCT GAG GTT CAG CTG GTC GAG TCT GGA GGC GGG CTT GTC CAG CCT
 CAC CGC GTT CGA CTC CAA GTC GAC CAG CTC AGA CCT CCG CCC GAA CAG GTC GGA
 V A Q A E V Q L V E S G G G L V Q P>

1140 1150 1160 1170 1180
 GGA GGG AGC CTG CGT CTC TCT TGT GCA GCA AGC GGC TTC GAC TTT TCC CGT TAC
 CCT CCC TCG GAC GCA GAG AGA ACA CGT CGT TCG CCG AAG CTG AAA AGG GCA ATG
 G G S L R L S C A A S G F D F S R Y>

1190 1200 1210 1220 1230 1240
 GAT ATG TCC TGG GTG CCG CAG GCA CCT GGG AAG CGC CTG GAG TGG GTG GCA TAC
 CTA TAC AGG ACC CAC GCC GTC CGT GGA CCC TTC GCG GAC CTC ACC CAC CGT ATG
 D M S W V R Q A P G K R L E W V A Y>

1250 1260 1270 1280 1290
 ATT AGC TCC GGA GGC GGC TCT ACA TAC TTC CCG GAC ACC GTC AAG GGC CGT TTC
 TAA TCG AGG CCT CCG CCG AGA TGT ATG AAG GGC CTG TGG CAG TTC CCG GCA AAG
 I S S G G G S T Y F P D T V K G R F>

1300 1310 1320 1330 1340
 ACC ATT TCC CGG GAC AAT GCA AAG AAT ACC CTT TAC CTC CAG ATG AAC TCT CTC
 TGG TAA AGG GCC CTG TTA CGT TTC TTA TGG GAA ATG GAG GTC TAC TTG AGA GAG
 T I S R D N A K N T L Y L Q M N S L>

ES 2 373 953 T3

1350 1360 1370 1380 1390 1400
 CGC GCA GAG GAC ACA GCA GTG TAT TAC TGT GCA CGG CAG AAC AAG AAA CTG ACC
 GCG CGT CTC CTG TGT CGT CAC ATA ATG ACA CGT GCC GTC TTG TTC TTT GAC TGG
 R A E D T A V Y Y C A R Q N K K L T>

 1410 1420 1430 1440 1450
 TGG TTT GAC TAC TGG GGA CAG GGG ACC CTT GTG ACA GTC TCC TCT GCT TCT ACA
 ACC AAA CTG ATG ACC CCT GTC CCC TGG GAA CAC TGT CAG AGG AGA CGA AGA TGT
 W F D Y W G Q G T L V T V S S A S T>

 1460 1470 1480 1490 1500 1510
 AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC
 TTC CCG GGT AGC CAG AAG GGG GAC CGT GGG AGG AGG TTC TCG TGG AGA CCC CCG
 K G P S V F P L A P S S K S T S G G>

 1520 1530 1540 1550 1560
 ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG
 TGT CGC CGG GAC CCG ACG GAC CAG TTC CTG ATG AAG GGG CTT GGC CAC TGC CAC
 T A A L G C L V K D Y F P E P V T V>

 1570 1580 1590 1600 1610
 TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA
 AGC ACC TTG AGT CCG CGG GAC TGG TCG CCG CAC GTG TGG AAG GGC CGA CAG GAT
 S W N S G A L T S G V H T F P A V L>

 1620 1630 1640 1650 1660 1670
 CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC
 GTC AGG AGT CCT GAG ATG AGG GAG TCG TCG CAC CAC TGG CAC GGG AGG TCG TCG
 Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S>

 1680 1690 1700 1710 1720
 TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG
 AAC CCG TGG GTC TGG ATG TAG ACG TTG CAC TTA GTG TTC GGG TCG TTG TGG TTC
 L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K>

 1730 1740 1750 1760 1770 1780
 GTC GAC AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC GCC GCG
 CAG CTG TTC TTT CAA CTC GGG TTT AGA ACA CTG TTT TGA GTG TGT ACG CGG CGC
 V D K K V E P K S C D K T H T C A A>

 1790 1800 1810 1820
 TGA TGA GGATCCAAGCTTGC GGCCGGAATTCACCTGGCCG
 ACT ACT CCTAGGTTCGAACGCCGGCGCTTAAGTGACCGGC
 * *>

 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
 TCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCC
 AGCAAAATGTTGCAGCACTGACCCTTTTGGGACCGCAATGGGTTGAATTAGCGGAACGTCGTGTAGGGGG

 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960
 TTTCGCCAGCTCGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAAT
 AAAGCGGTCGAGCGCATTATCGCTTCTCCGGGCGTGCGTAGCGGGAAGGGTTGTCAACGCGTCGGACTTA

 1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030
 GGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGATAAATTC
 CCGCTTACCGCGGACTACGCCATAAAAAGAGGAATGCCTAGACACGCCATAAAGTGTGGCGTATTTAAGGG

 2040 2050
 TGTTTTGGCGGATGAGAGAA
 ACAAACCGCCTACTCTCTT

Figura 12

