

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 484**

51 Int. Cl.:
C07K 16/24 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04817825 .5**
96 Fecha de presentación: **12.11.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1685152**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.08.2006**

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

30 Prioridad:
12.11.2003 US 706689

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.07.2012

73 Titular/es:
ABBOTT LABORATORIES
D-377 AP6A/1100 Abbott Park Road
Abbott Park, IL 60064, US

72 Inventor/es:
GHAYUR, Tariq;
LABKOVSKY, Boris;
VOSS, Jeffrey W.,;
GREEN, Larry;
BABCOOK, John;
JIA, Xiao-chi;
WIELER, James;
KANG, Jaspal Singh y
HEDBERG, Brad

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

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).

ES 2 385 484 T3

DESCRIPCIÓN

Proteínas de Unión a IL-18.

5 **Campo de la Invención**

La presente invención se refiere a proteínas de unión a interleuquina 18 (IL-18), y específicamente a sus usos en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas.

10 **Antecedentes de la Invención**

La interleuquina-18 (IL-18) fue descrita originalmente en 1989 como factor inductor del interferón gamma (IGIF) y como citoquina pro-inflamatoria con diferentes funciones además de una capacidad para inducir interferón gamma. Estas propiedades biológicas incluyen la activación de NF-kb, la expresión del ligando Fas, la inducción de quimioquinas tanto CC como CXC, y el aumento de la producción del virus de la inmunodeficiencia humana competente. Debido a la capacidad de IL-18 para inducir la producción de interferón gamma en células T y macrófagos, juega un importante papel en las respuestas inmunitarias de tipo Th1 y participa en la inmunidad tanto innata como adquirida. La IL-18 está relacionada con la familia IL-1 en términos tanto de la estructura como de la función. Para las revisiones de la estructura, la función y la actividad de la IL-18, véanse por ejemplo Dinarello, C. et al. (1998) J. Leukoc. Biol. 63:658-654; Dinarello, C.A. (1999) Methods 19:121-132; y Dinarello, C.A. (1999) J. Allergy Clin. Immunol. 103:11-24; (McInnes, I.B. et al. (2000) Immunology Today 21:312-315; Nakanishi, K. et al (2001) Ann. Rev. Immunol 19:423-474.

La pro-IL-18 intracelular es procesada proteolíticamente a una forma activa de 18 kDa en células estimuladas con endotoxinas por la caspasa 1 (Ghayur, T. et al., (1997) Nature 386:619-623; Gu, Y. et al., (1997) Science 275:206-209) y en células estimuladas por ADN bacteriano o Fas-L por las caspasas 4, 5 y 6 (Tsutsui, H. et al., (1999) Immunity 11:359-67; Ghayur, T., *Observaciones No Publicadas*). La pro-IL-18 también es procesada proteolíticamente por otras proteasas tales como la proteinasa 3 de neutrófilos (Sugawara, S. et al., (2001) J. Immunol., 167, 6568-6575), la caspasa 3 (Akita, K. et al., (1997) J. Biol. Chem. 272, 26595-26603), y las serina proteasas elastasa y catepsina (Gracie J. A., et al., (2003) Journal of Leukocyte Biology 73, 213-224). Tanto la IL-18 humana como la murina carecen de una secuencia líder clásica y el mecanismo de liberación de la IL-18 madura por las células no es bien conocido.

Las actividades biológicas de la IL-18 están mediadas por la unión de IL-18 a un receptor de IL-18 heterodimérico (IL-18R) que consta de dos subunidades: la subunidad α (un miembro de la familia de IL-1R, también denominado proteína relacionada con IL-1R 1 o IL-1Rrp1) y la subunidad β (también denominada proteína accesoria de IL-18R, IL-18AP o AcPL). La subunidad IL-18R α se une a IL-18 directamente, pero no es competente para la transducción de la señal. La subunidad β no se une a IL-18 por sí misma, si no que en conexión con la subunidad α forma el receptor de alta afinidad ($K_D = -0,3$ nM) que es necesario para la transducción de la señal (Sims, J.E., (2002) Current Opin Immunol. 14:117-122). La transducción de la señal de IL-18 a través del complejo IL-18R $\alpha\beta$ es similar a los sistemas de receptores IL-1R y de tipo Toll (TLR). La señalización de IL-18R utiliza moléculas de transducción de la señal, tales como MyD88, IRAK, TRAF6 y produce respuestas similares (p. ej. activación de las quinasas NIK, I κ B, NF-kB, JNK y la quinasa p38 MAP) como lo hace IL-1. El requerimiento de IL-18R α y las moléculas de transducción de la señal en la mediación en la bioactividad IL-18 ha sido confirmado utilizando genes desactivados de la subunidad IL-18R α (Hoshino K., et al (1999) J. Immunol. 162:5041-5044;), MyD88 (Adachi O., et al. (1998) Immunity 9:143-150) o IRAK (Kanakaraj P., (1999) J. Exp. Med. 189:1129-1138) respectivamente.

Los anticuerpos que se unen a IL-18 son conocidos en la técnica. Los anticuerpos de ratón competentes para neutralizar IL-18 se describen en el documento EP 0 974 600. En el documento WO 00/56771 se describen anticuerpos de rata para IL-18 humano que, debido a su origen tienen desventajas conocidas para su uso en seres humanos, en particular inmunogenicidad en seres humanos. Los anticuerpos humanos para IL-18 han sido descritos en la publicación PCT WO 0158956. La presente invención proporciona una familia novedosa de proteínas de unión, anticuerpo humanos, y fragmentos de los mismos, capaces de unirse a IL-18, unirse con elevada afinidad, y de unirse y neutralizar IL-18.

55 **Compendio de la Invención**

Esta invención tiene que ver con proteínas de unión a IL-18, concretamente anticuerpos para IL-18 humana, así como con métodos de elaboración y uso de tales proteínas de unión. Un aspecto de la invención tiene que ver con un método de regulación de la expresión génica utilizando un modulador de IL-18.

Un aspecto de esta descripción tiene que ver con una proteína de unión que comprende un dominio de unión a un antígeno capaz de unirse a la IL-18 humana.

El dominio de unión a antígeno de la invención comprende las siguientes CDR: Residuos 31-35 del SEQ ID NO: 6; Residuos 50-66 del SEQ ID NO: 6; Residuos 99-110 del SEQ ID NO: 6; Residuos 24-34 del SEQ ID NO: 7; Residuos 50-56 del SEQ ID NO: 7; y Residuos 89-98 del SEQ ID NO: 7.

5 En otra realización preferida la proteína de unión comprende un dominio V_H . Preferiblemente el dominio V_H comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 6. En otra realización la proteína de unión comprende un dominio V_L . Preferiblemente el dominio V_L comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 7.

10 En una realización preferida la proteína de unión comprende un dominio V_H y uno V_L . Más preferiblemente la proteína de unión comprende un dominio V_H que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 6 y el dominio V_L del SEQ ID NO: 7 NO: 6.

15 En otra realización la proteína de unión comprende adicionalmente un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en un dominio constante de IgM humana; un dominio constante de IgG1 humana; un dominio constante de IgG2 humana; un dominio constante de IgG3 humana; un dominio constante de IgG4 humana; un dominio constante de IgE humana y un dominio constante de IgA humana. Preferiblemente el dominio de la región constante de la inmunoglobulina es un dominio constante de IgG1 humana. Preferiblemente al menos un residuo de aminoácido se reemplaza en el dominio de la región constante de la cadena pesada de manera que se alteren las funciones efectoras del anticuerpo. Más preferiblemente el dominio constante de la IgG1 humana comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 2, y el SEQ ID NO: 3.

25 En otra realización la proteína de unión comprende adicionalmente un dominio constante de la cadena ligera de la inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en un dominio constante kappa de Ig humana; y un dominio constante lambda de Ig humana. Preferiblemente el dominio constante kappa de Ig humana comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 y el dominio constante lambda de la Ig humana comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5.

30 En otra realización la proteína de unión comprende una región pesada constante de Ig que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: el SEQ ID NO: 2, y el SEQ ID NO: 3; una región ligera constante de IG que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: el SEQ ID NO: 4, y el SEQ ID NO: 5; una región pesada variable de Ig que tiene una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 6; y una región ligera variable de Ig que tiene una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 7

35 En otra realización la proteína de unión comprende una región pesada constante de Ig que tiene una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 3; una región ligera constante de IG que tiene una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 4; y una región pesada variable de Ig que tiene una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 6; y una región ligera variable de Ig que tiene una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 7.

40 En otra realización la unión se selecciona del grupo que consiste en una molécula de inmunoglobulina o variantes funcionales de la misma conocidas en la técnica, cuyas variantes conservan la propiedad de unión característica de la proteína de unión. Los ejemplos de las realizaciones de inmunoglobulinas específicas incluyen, pero no están limitadas a scFv; un anticuerpo monoclonal; un anticuerpo humano; un anticuerpo quimérico; un anticuerpo humanizado; un anticuerpo de un solo dominio; un fragmento Fab; un fragmento Fab'; un F(ab')₂; un Fv; un FV conectado a disulfuro, y un anticuerpo biespecífico o de especificidad dual. Muy preferiblemente la proteína de unión es un anticuerpo humano.

50 Otro aspecto de la invención proporciona una proteína de unión neutralizadora que comprende una cualquiera de las proteínas de unión descritas anteriormente donde la proteína de unión neutralizadora es capaz de neutralizar IL-18. Preferiblemente la proteína de unión neutralizadora es capaz de neutralizar una cualquiera de pro-IL-18 humana; IL-18 madura humana o IL-18 truncada humana. En otra realización la proteína de unión neutralizadora disminuye la capacidad de IL-18 para unirse a su receptor. Preferiblemente la proteína de unión neutralizadora disminuye la capacidad de pro-IL-18 humana; IL-18 madura humana o IL-18 truncada humana para unirse a su receptor.

55 En otra realización la proteína de unión neutralizadora es capaz de inhibir una o más de las actividades biológicas de IL-18 seleccionadas del grupo que consiste en, modulación de Th1; modulación de Th2 (Nakanishi K., et al (2001) Cytokine and Growth Factor Rev. 12:53-72); modulación de Nk; modulación de neutrófilos; modulación del linaje de monocitos-macrófagos; modulación de neutrófilos; modulación de eosinófilos; modulación de células B; modulación de citoquinas; modulación de quimioquinas; modulación de moléculas de adherencia; y modulación del reclutamiento celular.

60 En una realización preferida la proteína de unión neutralizadora tiene una constante de disociación (K_D) seleccionada del grupo que consiste en: a lo sumo alrededor de 10^{-7} M; a lo sumo alrededor de 10^{-8} M; a lo sumo

alrededor de 10^{-9} M; a lo sumo alrededor de 10^{-10} M; a lo sumo alrededor de 10^{-11} M; a lo sumo alrededor de 10^{-12} M; y a lo sumo 10^{-13} M.

5 En otra realización la proteína de unión neutralizadora tiene una constante de unión seleccionada del grupo que consiste en: al menos alrededor de $10^2 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; al menos alrededor de $10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; al menos alrededor de $10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; al menos alrededor de $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; y al menos alrededor de $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$.

10 En otra realización más la proteína de unión neutralizadora tiene una constante de desunión seleccionada del grupo que consiste en: a lo sumo alrededor de 10^{-3}s^{-1} ; a lo sumo alrededor de 10^{-4}s^{-1} ; a lo sumo alrededor de 10^{-5}s^{-1} ; y a lo sumo alrededor de 10^{-6}s^{-1} .

15 Otro aspecto de la invención proporciona una proteína de unión marcada que comprende una cualquiera de las proteínas de unión descritas anteriormente donde la proteína de unión se conjuga con una marca detectable. Preferiblemente la marca detectable se selecciona del grupo que consiste en una radiomarca, una enzima, una marca fluorescente, una marca luminiscente, una marca bioluminiscente, una marca magnética y biotina. Más preferiblemente la radiomarca es H^3 , C^{14} , S^{35} , Y^{90} , Tc^{99} , In^{111} , I^{125} , I^{131} , Lu^{177} , Ho^{166} , o Sm^{153} .

20 Otro aspecto de la invención proporciona una proteína conjugada que comprende una cualquiera de las proteínas de unión descritas anteriormente donde dicha proteína de unión se conjuga con un agente terapéutico o citotóxico. Preferiblemente el agente terapéutico o citotóxico se selecciona del grupo que consiste en un antimetabolito; un agente alquilante; un antibiótico; un factor de crecimiento; una citoquina; un agente anti-angiogénico; un agente anti-mitótico; una antraciclina; una toxina; y un agente apoptótico.

25 Una realización tiene que ver con un ácido nucleico aislado que codifica una cualquiera de las proteínas de unión descritas anteriormente. Una realización adicional proporciona un vector que comprende el ácido nucleico aislado descrito anteriormente donde dicho vector se selecciona del grupo que consiste en pcDNA; pTT (Durocher et al., Nucleic Acids Research 2002, Vol 30, No.2); pTT3 (pTT con un sitio de clonación múltiple adicional; pEFBOS (Mizushima, S. y Nagata, S., (1990) Nucleic acids Research Vol 18, No. 17); pBV; pJV; y pBJ.

30 En otra realización una célula anfitriona es transformada con el vector. Preferiblemente la célula anfitriona es una célula procariótica. Más preferiblemente la célula anfitriona es E.Coli. En una realización relacionada la célula anfitriona es una célula eucariótica. Preferiblemente la célula eucariótica se selecciona del grupo que consiste en células protistas, células animales, células vegetales y células fúngicas. Más preferiblemente la célula anfitriona es una célula de mamífero incluyendo, pero no limitada a, CHO y COS; o una célula fúngica tal como Saccharomyces cerevisiae; o una célula de insecto tal como Sf9.

35 Otro aspecto de la invención proporciona un método para la producción de una proteína de unión que se une a IL-18 humana, que comprende cultivar una cualquiera de las células anfitrionas descritas anteriormente en un medio de cultivo en condiciones suficientes para producir una proteína de unión que se une a IL-18 humana. Otra realización proporciona una proteína de unión producida de acuerdo con el método descrito anteriormente.

40 Otro aspecto de la invención proporciona una proteína de unión cristalizada que comprende una cualquiera de las proteínas de unión descritas anteriormente, donde la proteína de unión existe en forma de cristal. Preferiblemente el cristal es un cristal de liberación controlada farmacéutico son portador. En una realización la proteína de unión que existe en forma de cristal tiene una vida media in vivo superior a la de la contraparte soluble de la proteína de unión. En otra realización la proteína de unión conserva su actividad biológica después de la cristalización.

45 Una realización proporciona una composición para la liberación de una proteína de unión donde la composición comprende una formulación que a su vez comprende una proteína de unión cristalizada como se ha descrito anteriormente y un ingrediente; y al menos un portador polimérico. Preferiblemente el portador polimérico es un polímero seleccionado entre uno o más del grupo que consiste en: poli(ácido acrílico), poli(cianoacrilatos), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(depsipéptido), poli(ésteres), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli(b-hidroxibutirato), poli(caprolactona), poli(dioxanona); poli(etilenglicol), poli((hidroxipropil)metacrilamida, poli[(organo)fosfazeno], poli(ortoésteres), poli(alcohol vinílico), poli(vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maleico-alquilviniléter, polioles pluronic, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, combinaciones y copolímeros de los mismos. Preferiblemente el ingrediente se selecciona del grupo que consiste en albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, metoxipoli(etilenglicol) y polietilenglicol. Otra realización proporciona un método para el tratamiento de un mamífero que comprende la etapa de administración al mamífero de una cantidad eficaz de la composición descrita anteriormente.

60 Otro aspecto de la descripción proporciona un método para la regulación de la expresión génica de un gen de interés que comprende las etapas de proporcionar un polipéptido IL-18 o un modulador de IL-18; y poner en contacto

ES 2 385 484 T3

el polipéptido o modulador con una célula donde el gen de interés se selecciona del grupo que consiste en los genes identificados mediante los números de Identificación Genbank:

NM_000389,	NM_002198,	NM_002163,	NM_006144,	NM_006515,	NM_007185,	NM_002288,
NM_003661,	NM_021958,	NM_001335,	Hs.382006,	NM_020125,	NM_007210,	NM_021798,
NM_013324,	M11313,	D88152,	NM-001103,	U37519,	NM_000697,	J03600,
NK_014578,	566793,	U47054,	L19871,	M81181,	NM_001188,	U15460,
NM_014417,	Z23115,	NM_001713,	U45878,	U37546,	U72649,	U49187,
J03507,	U50360	XM_071866,	NM_005623,	Z32765,	Z11697,	XM_071866,
U51096,	M83667,	D87469,	L07765,	U66468,	X14830,	L29217,
X15880,	NM_001851,	M27691,	M37435,	X13589,	X16866,	X59131,
NM_004393,	U73328,	L19267,	U53445,	X68277,	U48807,	NM_001950,
U87269,	M57730,	X52541,	J04076,	X63741,	L07077,	M62831,
M60830,	U53786,	NM_001988,	NM_000141,	M23668,	U60062,	NM_000141,
U49973,	U89995,	U27326,	A28102,	M25667,	L34357,	U19523,
L01406,	U03486,	X68285,	Z18859,	D49958,	D43772,	AC000099,
M57731,	X53800,	M91036,	D16583,	X64877,	X58431,	M16937,
NM_014468,	X92814,	L19314,	M26665,	D10995,	L41147,	M24283,
S81914,	J03171,	J00219,	NM_000619,	NM_000585,	U31628,	X04500,
M27492,	X01057,	M26062,	Y00081,	Y00787,	Z31695,	X06256,
X57206,	U20734,	NM_014879,	D31762,	D42038,	NM_005551,	NM_014846,
X06182,	NM_005551,	X07730,	M13955,	M57710,	S83362,	NM_002314,
NM_005569,	U49957,	U89922,	X14008,	U59914,	D14497,	X59727,
NM_000429,	U43944,	X72755,	NM_021230,NM_005951,		X78710,	X70991,
M32011,	S77763,	M58603,	S76638,	M69043,	U91616,	D86425,
L13740,	U44848,	U79251,	M27288,	AF000234,	D50640,	L20971,
L10343,	U77735,	NM_003579,	U17034,	AB000584,	X63131,	D11428,
NM_032940,	NM_005035,	NM_003579,	M18255,	L01087,	D38128,	Y10375,
D15049,	M31166,	U59877,	NM_003579,	U64675,	S57153,	NM_002903,
NG_000013,	X75042,	M83221,	NM_000537,	U22314,	S59049,	U70426,
U22377,	U38480,	L10338,	M23178,	M69203,	NM_005409,	D79206,
NM_005065,	NM_004186,	J03764,	NM_006802,	D89077,	NM_003037,	M91463,
D82326,	L05568,	U96094,	X83301,	D21267,	L31529,	M62800,
NM_021014,	Z35093,	NM_005816,	L25444,	M95787,	NM_005421,	L47345,
M57732,	NM-003205,	M96956,	U19878,	M92357,	M59465,	X83490,
U37518,	NM_003294,	U19261,	U78798,	S69790,	U53476,	L15309,
U78722,	X57809,	U79249,	AB000464,	X77744,	U79248,	AI420129,
HG2981- HT3127,		HG3548- HT3749,		HG870- HT870,		HG4333- HT4603,
HG3111- HT3287,		HG4593- HT4998,		HG961- HT961,		HG1877- HT1917,
HG3115- HT3291,		HG4115- HT4385,		y HG3925- HT4195.		

Preferiblemente el modulador es un antagonista. Más preferiblemente el modulador es una proteína de unión o una proteína de unión neutralizadora.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión o una proteína de unión neutralizadora como las descritas anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización adicional la composición farmacéutica comprende al menos un agente terapéutico adicional para el tratamiento de un trastorno en el que actividad de IL-18 es perjudicial. Preferiblemente el agente adicional se selecciona del grupo que consiste en: inhibidores de la angiogénesis (incluyendo pero no limitados a anticuerpos anti-VEGF o trampa de VEGF); inhibidores de quinasas (incluyendo pero no limitados a inhibidores de KDR y TIE-2); bloqueadores de la coestimulación molecular (incluyendo pero no limitados a anti-B7.1, anti-B7.2, CTLA4-Ig, anti-CD20); bloqueadores de moléculas de adherencia (incluyendo pero no limitados a Acs anti-LFA-1, Acs anti-selectina E/L, inhibidores de molécula pequeña); anticuerpos anti-citoquina o fragmentos funcionales de los mismos (incluyendo pero no limitados a anti-IL-12, anti-TNF, anticuerpos anti-IL-6/receptor de citoquina); metotrexato; corticoesteroides; ciclosporina; rapamicina; FK506; y agentes antiinflamatorios no esteroideos.

En otro aspecto, la invención proporciona una proteína de unión para su uso en un método para la inhibición de la actividad humana de IL-18 que comprende poner en contacto IL-18 humana con una proteína de unión descrita anteriormente de manera que se inhiba la actividad humana de IL-18. En un aspecto relacionado la invención proporciona una proteína de unión para su uso en un método para la inhibición de la actividad humana de IL-18 en un sujeto humano que sufra un trastorno en el que actividad de IL-18 es perjudicial, que comprende la administración al sujeto humano de una proteína de unión descrita anteriormente de manera que se inhiba la actividad humana de IL-18 en el sujeto humano y se logre el. Preferiblemente el trastorno se selecciona del grupo que comprende artritis reumatoide, osteoartritis, artritis crónica juvenil, artritis de Lyme, artritis psoriásica, artritis reactiva, y artritis séptica, espondiloartropatía, lupus eritematoso generalizado, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes mellitus insulino dependiente, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, dermatitis, esclerodermia, enfermedad de injerto contra anfitrión, rechazo en el trasplante de órganos (incluyendo pero no limitado a médula ósea y rechazo de órganos sólidos), enfermedad inmunitaria aguda o crónica asociada con el trasplante de órganos, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Graves, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, purpura de Henoch-Schoenlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis activa crónica, uveítis, choque séptico, síndrome de choque tóxico, síndrome de sepsis, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasitarias, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversa aguda, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, ictus, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, neoplasias, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, enfermedad de Addison, deficiencia poliglandular de tipo I y deficiencia poliglandular de tipo II, esporádicas, síndrome de Schmidt, síndrome de dificultad respiratoria (aguda) del adulto, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía psoriásica, artropatía colítica ulcerosa, sinovitis enteropática, clamidia, artropatía asociada a yersinia y salmonella, espondiloartropatía, enfermedad ateromatosa/arteriosclerosis, alergia atópica, enfermedad bulosa autoinmune, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, penfigoide, enfermedad de IgA lineal, anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica positiva de Coombs, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis miálgica/Enfermedad de Royal Free, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de células gigantes, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmune criptogénica, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, Enfermedades Relacionadas con la Inmunodeficiencia Adquirida, Hepatitis B, Hepatitis C, inmunodeficiencia variada común (hipogammaglobulinemia variable común), cardiopatía dilatada, infertilidad femenina, insuficiencia ovárica, insuficiencia ovárica prematura, enfermedad pulmonar fibrótica, alveolitis fibrosante criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial post-inflamatoria, neumonitis intersticial, enfermedad pulmonar intersticial asociada a enfermedad del tejido conectivo, enfermedad pulmonar asociada a enfermedad del tejido conectivo mixta, esclerosis sistémica asociada a enfermedad pulmonar intersticial, artritis reumatoide asociada a enfermedad pulmonar intersticial, lupus eritematoso generalizado asociado a enfermedad pulmonar, dermatomiositis/polimiositis asociadas a enfermedad pulmonar, enfermedad de Sjögren asociada a enfermedad pulmonar, espondilitis anquilosante asociada a enfermedad pulmonar, enfermedad pulmonar, enfermedad pulmonar difusa vasculítica, hemosiderosis asociada a enfermedad pulmonar, enfermedad pulmonar intersticial inducida por fármacos, fibrosis por radiación, bronquiolitis obliterans, neumonía eosinofílica crónica, enfermedad pulmonar infiltrante linfocítica, enfermedad pulmonar intersticial postinfecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmune, hepatitis autoinmune de tipo 1 (hepatitis autoinmune clásica o lupoides), hepatitis autoinmune de tipo 2 (hepatitis anti-anticuerpo LKM), hipoglicemia mediada por procesos autoinmunes, resistencia a insulina de tipo B con acantosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad inmunitaria aguda asociada con el trasplante de órganos, enfermedad inmunitaria crónica asociada con el trasplante de órganos, osteoartritis, colangitis esclerosante primaria, psoriasis de tipo 1, psoriasis de tipo 2, leucopenia idiopática, neutropenia autoinmune, enfermedad renal NOS, glomerulonefritis, vasculitis microscópica de los riñones, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso discoide, infertilidad masculina idiopática o NOS, autoinmunidad espermática, esclerosis múltiple (todos los subtipos), oftalmía simpática, hipertensión pulmonar secundaria a enfermedad del tejido conectivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nodosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumatoide, enfermedad de Still, esclerosis generalizada, síndrome de Sjögren, enfermedad/arteritis de Takayasu, trombocitopenia autoinmune, trombocitopenia idiopática, enfermedad tiroidea

autoinmune, hipertiroidismo, hipotiroidismo autoinmune goitrosa (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmune atrófico, mixoedema primario, uveítis facogénica, vasculitis primaria vitiligo, enfermedad hepática aguda, enfermedades hepáticas crónicas, cirrosis alcohólica, lesión hepática inducida por alcohol, coleostasis, enfermedad hepática idiosincrática. hepatitis inducida por fármacos, esteatohepatitis no alcohólica, alergia y asma, infección por estreptococos del grupo B (GBS), trastornos mentales (*p. ej.*, depresión y esquizofrenia), enfermedades mediadas por Tipo Th2 y Tipo Th1, y cánceres tales como pulmón, mama, estómago, vejiga, colon, páncreas, ovario, próstata y cáncer de recto y neoplasias hematopoyéticas (leucemia y linfoma).

En otro aspecto la invención proporciona una proteína de unión para su uso en un método de tratamiento de un paciente que padece un trastorno en el que IL-18 es perjudicial que comprende la etapa de administración de una cualquiera de las proteínas de unión descritas anteriormente antes, durante, o después de la administración de un segundo agente, como se ha comentado anteriormente.

Otro aspecto de la invención proporciona una proteína de unión neutralizadora seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo humano; un anticuerpo quimérico; un anticuerpo humanizado y un anticuerpo injertado a CDR, donde la proteína de unión neutralizadora es capaz de unirse a IL-18 madura humana y pro-IL-18 humana.

Otro aspecto de la invención proporciona una proteína de unión neutralizadora seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo humano; un anticuerpo quimérico; un anticuerpo humanizado y un anticuerpo injertado a CDR, donde la proteína de unión neutralizadora no es capaz de competir con el anticuerpo 125-2H para unirse a IL-18 humana.

Otro aspecto de la invención proporciona una proteína de unión neutralizadora seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo humano; un anticuerpo quimérico; un anticuerpo humanizado y un anticuerpo injertado a CDR, donde la proteína de unión neutralizadora no es capaz de competir con IL-18BP para unirse a IL-18 humana.

En una realización preferida la proteína de unión es capaz de unirse a IL-18 madura humana. En otra realización la proteína de unión no es capaz de competir con el anticuerpo 125-2H para unirse a IL-18 humana. En otra realización más la proteína de unión no es capaz de competir, con IL-18BP para unirse a IL-18 humana.

Descripción Detallada de la invención

Esta invención tiene que ver con proteínas de unión a IL-18, particularmente anticuerpos anti-IL-18, o sus porciones de unión al antígeno, que se unen a la misma. Algunos aspectos de la invención se refieren a anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, y sus composiciones farmacéuticas, así como a ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes y células anfitrionas para elaborar tales anticuerpos y fragmentos. Los métodos para la utilización de los anticuerpos de la invención para detectar IL-18 humana, para inhibir la actividad humana de IL-18, in vitro o in vivo, y para regular la expresión génica también son proporcionados por la descripción. Esta invención también tiene que ver con una IL-18 truncada. En aspectos relacionados la invención también tiene que ver con ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes y células anfitrionas para elaborar IL-18 truncada.

A no ser que se defina de otro modo en la presente memoria, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán los significados que son comprendidos comúnmente por los expertos normales en la técnica. Adicionalmente, a no ser que el contexto requiera lo contrario, los términos en singular incluirán las pluralidades y los términos en plural incluirán el singular. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a no ser que se indique lo contrario. Además, el uso del término "incluyendo", así como otras formas diferentes, tales como "incluye" e "incluido", no es limitante. Asimismo, términos tales como "elemento" o "componente" abarcan los elementos y los componentes que comprenden una unidad y los elementos y los componentes que comprenden más de una subunidad a no ser que se indique específicamente lo contrario.

Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los mecanismos de, cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química e hibridación de proteínas y ácido nucleico descritas en la presente memoria son las bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Los métodos y mecanismos de la presente invención se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que son citadas y comentadas a lo largo de la presente memoria a no ser que se indique lo contrario. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, según se levan a cabo en la técnica o como se describe en la presente memoria. Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos de laboratorio y las técnicas de, química analítica, química orgánica sintética, y química médica y farmacéutica descritas en la presente memoria son las bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Se utilizan técnicas convencionales para la síntesis química, los análisis químicos, la preparación farmacéutica, la formulación, y la liberación, y el tratamiento de pacientes.

Para que la presente invención sea entendida más fácilmente, los términos seleccionados se definen más abajo.

El término "Polipéptido" según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. Los términos "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente con el término polipéptido y también hacen referencia a una cadena polimérica de aminoácidos. El término "polipéptido" abarca proteínas nativas o artificiales, fragmentos de proteínas y análogos polipeptídicos de una secuencia de proteína. El polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

El término "proteína aislada" o "polipéptido aislado" es una proteína o polipéptido que en virtud de su origen o fuente de obtención son están asociados con componentes asociados naturalmente que los acompañan en su estado nativo; están sustancialmente libres de otras proteínas de las mismas especies; son expresados por una célula de una especie diferente; o no se producen en la naturaleza. De este modo, un polipéptido que es sintetizado químicamente o sintetizado en un sistema celular diferente de la célula a partir de la que se origina naturalmente será "aislada" de sus componentes asociados naturalmente. Una proteína se puede entregar también sustancialmente libre de componentes asociados naturalmente mediante aislamiento, utilizando mecanismos de purificación de proteínas bien conocidos en la técnica.

El término "recuperación" según se utiliza en la presente memoria, hace referencia al procedimiento de entrega de una especie química tal como un polipéptido sustancialmente libre de componentes asociados naturalmente mediante aislamiento, p. ej., utilizando mecanismos de purificación de proteínas bien conocidos en la técnica.

El término "IL-18" según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a la citoquina también conocida como factor inductor de interferón-gamma (IGIF), esto es, una citoquina proinflamatoria, que exhibe diversas funciones además de la capacidad de inducir interferón gamma. El término "IL-18 humana" utilizado indistintamente con el término "hIL-18" abarca el polipéptido de SEQ ID NO: 1 y fragmentos del mismo, incluyendo pero no limitado a, pro-IL-18 humana, IL-18 humana madura, y cualquier IL-18 troncada humana que conserve la actividad biológica de IL-18 como se describe en la presente memoria. El término "pro-IL-18 humana" según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un polipéptido del SEQ ID NO: 1. El término "IL-18 humana madura" según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a los residuos 37-193 del SEQ ID NO: 1, y el término "IL-18 troncada humana" según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a los residuos 59-193 del SEQ ID NO: 1. Preferiblemente la IL-18, y los fragmentos de la misma, son biológicamente activos. El término "IL-18 humana recombinante" o "rhIL-18" según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a IL-18 humana generada *in vitro* utilizando técnicas de ADN recombinante.

La "actividad biológica de IL-18" según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a todas las propiedades biológicas inherentes de la citoquina IL-18. Las propiedades biológicas de IL-18 incluyen pero no están limitadas a la unión al receptor de IL-18; la promoción de la maduración y la activación de las células Th1 y Tc1; la promoción de la producción de citoquinas tales como TNF, IFN γ y IL-1 β mediante diversos tipos celulares; la promoción de macrófagos para liberar citoquinas tales como TNF y IFN γ , produciendo NO; la promoción de la expresión de FasL, citotoxicidad y liberación de citoquinas (IFN γ) desde las células NK; la promoción de la liberación de citoquinas/quimioquinas, estallido respiratorio, liberación de gránulos, expresión de moléculas de adherencia en Neutrófilos; la promoción de la migración de la células endoteliales y promoviendo de este modo la angiogénesis; la promoción de la liberación de GAG, producción de MMP y NO en Condrocitos; la promoción de la expresión COX2 en algunas células; y la reducción de la proliferación celular en algunas células.

Los términos "unión específica" o "unido específicamente", según se utiliza en la presente memoria, en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína, o un péptido con una segunda especie química, significan que la interacción depende de la presencia de una estructura concreta (p. ej., un determinante antigénico o epítipo) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica en lugar de a proteínas generalmente. Si un anticuerpo es específico para un epítipo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítipo A (o A libre, no marcado), en una reacción que contiene "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

El término "anticuerpo", según se utiliza en la presente memoria, hace referencia en general a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) compuesta de cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), o cualquier fragmento funcional, mutante, variante, o derivación del mismo, que conserve las características de unión al epítipo esenciales de una molécula de Ig. Tales formatos de anticuerpos mutantes, variantes, o derivados son conocidos en la técnica. Las realizaciones no limitantes de los mismos se comentan más abajo.

En un anticuerpo completo, cada cadena pesada está compuesta de una región variable de la cadena pesada (abreviada en la presente memoria como HCVR o VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta de una región variable de la cadena ligera (abreviada en la presente memoria como LCVR o VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta de un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden dividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas,

denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

5 El término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (*p. ej.*, hIL-18). Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo completo. Tales realizaciones de anticuerpos pueden ser también biespecíficas, específicas duales, o multiespecíficas; unidas específicamente a dos o más antígenos diferentes. Los ejemplos de los fragmentos de unión abarcados por el término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmento Fab conectados mediante un puente disulfuro a la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que comprende un solo dominio variable; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, son codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, por medio de un conector sintético que posibilita su elaboración como una sola cadena proteica en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv (scFv) de cadena sencilla; véanse *p. ej.*, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Se pretende que tales anticuerpos de cadena sencilla estén incluidos dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo. También están incluidas otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tales como fragmentos bivalentes "diabodies". Los fragmentos bivalentes son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que los dominios VH y VL son expresados sobre una cadena polipeptídica sencilla, pero utilizando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios sobre la misma cadena, haciendo de ese modo que los dominios se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión al antígeno (véanse *p. ej.*, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123). Tales porciones de unión al anticuerpo son conocidas en la técnica (Kontermann y Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 págs. (ISBN 3-540-41354-5).

30 Aún más, un anticuerpo o porción unión al antígeno del mismo puede ser parte de una molécula de inmunoadherencia mayor, formada por medio de la asociación covalente o no covalente del anticuerpo o porción de anticuerpo con una o más proteínas o péptidos diferentes. Los ejemplos de tales moléculas de inmunoadherencia incluyen el uso de la región central de la estreptavidina para elaborar una molécula de scFv tetramérica (Kipriyanov, S.M., et al. (1995) Human Antibodies and Híbridomas 6:93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidina C-terminal para elaborar moléculas de scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S.M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058). Se pueden preparar porciones de anticuerpos, tales como fragmentos Fab y F(ab')₂, a partir de anticuerpos completos utilizando técnicas convencionales, tales como digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Por otra parte, los anticuerpos, las porciones de anticuerpos y las moléculas de inmunoadherencia se pueden obtener utilizando técnicas convencionales de ADN recombinante, como se describe en la presente memoria.

45 Se pretende que un "anticuerpo aislado", según se utiliza en la presente memoria haga referencia a un anticuerpo que esté sustancialmente libre de otros anticuerpos que tengan diferentes especificidades antigénicas (*p. ej.*, un anticuerpo aislado que se une específicamente a hIL-18 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de hIL-18). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a hIL-18 puede tener, no obstante, reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de IL-18 de otras especies. Por otra parte, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o sustancias químicas.

50 Se pretende que el término "anticuerpo humano", según se utiliza en la presente memoria incluya anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (*p. ej.*, mutaciones introducidas mediante mutagénesis al azar o de sitio específico in vitro o mediante mutación somática in vivo), por ejemplo en las CDR y en particular en CDR3. Sin embargo, no se pretende que el término "anticuerpo humano", según se utiliza en la presente memoria incluya anticuerpos en las que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamíferos, tales como un ratón, se hayan injertado en las secuencias marco humanas.

60 Se pretende que el término "anticuerpo humano recombinante", según se utiliza en la presente memoria incluya todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medio de métodos recombinantes, tales como anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transfectado a una célula anfitriona (descrito adicionalmente en la Sección II C, más abajo), anticuerpos aislados de una genoteca de anticuerpos humanos combinatoria, recombinante (Hoogenboom H.R., (1997) TIB Tech. 15:62-70; Azzazy H., y Highsmith W.E., (2002) Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo J.V., y Larrick J.W. (2002) BioTechniques 29:128-145; Hoogenboom H., y Chames P. (2000) Immunology Today 21:371-378), anticuerpos aislados de un animal (*p. ej.*, un

ratón) que es transgénico para los genes de la inmunoglobulina humana (véanse p. ej., Taylor, L. D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S-A., y Green L.L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Little M. et al (2000) Immunology Today 21:364-370) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique el empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertas realizaciones, no obstante, tales anticuerpos humanos recombinantes son sometidos a mutagénesis in vitro (o, cuando se utiliza un animal transgénico para las secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática in vivo) y de este modo las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque están derivadas de y relacionadas con secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir naturalmente en el repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos in vivo.

El término "anticuerpo quimérico" hace referencia un anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de la cadena ligera y pesada de una especie y secuencias de la región constante de otras especies, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de la cadena ligera y pesada murinas conectadas a regiones constantes humanas.

El término "anticuerpo injertado con CDR" hace referencia un anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de una especie pero en la que las secuencias de una o más de las regiones CDR de V_H y/o VL son remplazadas por secuencias de CDR de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de la cadena ligera y pesada murinas en las que una o más de las CDR murinas (p. ej., CDR3) han sido remplazadas por secuencias de CDR humanas.

El término "anticuerpo humanizado" hace referencia un anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de una especie no humana (p. ej., un ratón) pero en IAs que se ha alterado al menos una porción de la secuencia VH y/o VL para SER más "parecidas a las humanas", es decir, más similares a las secuencias variables de la línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo injertado con CDR, en el que se introducen secuencias de CDR humanas en secuencias VH y VL no humanas para remplazar las correspondientes secuencias de CDR no humanas.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "proteína de unión neutralizadora de hIL-18 " hace referencia a una proteína que se une específicamente a hIL-18 y neutraliza una actividad biológica de hIL-18. Preferiblemente una proteína de unión neutralizadora es un anticuerpo neutralizador cuya unión a hIL-18 da como resultado la inhibición de una actividad biológica de hIL-18. Preferiblemente la proteína de unión neutralizadora se une a hIL-18 y reduce una actividad biológica de IL-18 en al menos alrededor de 20%, 40%, 60%, 80%, 85% o más. Esta inhibición de una actividad biológica de hIL-18 por una proteína de unión neutralizadora se puede evaluar midiendo uno o más indicadores de la actividad biológica de hIL-18. Estos indicadores de la actividad biológica de hIL-18 se pueden evaluar mediante uno o más de los diversos análisis in vitro o in vivo convencionales conocidos en la técnica.

El término "epítupos" incluye cualquier determinante polipeptídico susceptible de unión específica a una inmunoglobulina o receptor de células T. En ciertas realizaciones, los determinantes epitópicos incluyen agrupamientos de moléculas de superficie químicamente activos tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, fosforilo, o sulfonilo, y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que está unida por un anticuerpo. En ciertas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

El término "resonancia de plasmón superficial", según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real por medio de la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas en una matriz biosensora, por ejemplo utilizando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden y Piscataway, NJ). Para descripciones adicionales, véanse Jönsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jönsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131; y Johnsson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277.

Se pretende que el término " K_{on} ", según se utiliza en la presente memoria haga referencia a la constante de unión para la asociación de un anticuerpo al antígeno para formar el complejo anticuerpo/antígeno como es conocido en la técnica.

Se pretende que el término " K_{off} ", según se utiliza en la presente memoria haga referencia a la constante de desunión para la disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno como es conocido en la técnica.

Se pretende que el término " K_d ", según se utiliza en la presente memoria haga referencia a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno concreta como es conocido en la técnica.

El término "proteína de unión marcada" según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a una proteína con una marca incorporada que proporciona la identificación de la proteína de unión. Preferiblemente, la marca es un marcador detectable, p. ej., incorporación de aminoácido radiomarcado o el anclaje a un polipéptido de radicales biotinilo que puede ser detectado mediante avidina marcada (p. ej., estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede ser detectada por medio de métodos ópticos o colorimétricos). Los ejemplos de las marcas para polipéptidos incluyen, pero no están limitados a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (p. ej., H³, C¹⁴, S³⁵, Y⁹⁰, Tc⁹⁹, In¹¹¹, I¹²⁵, I¹³¹, Lu¹⁷⁷, Ho¹⁶⁶, o Sm¹⁵³); marca fluorescentes (p. ej., FITC, rodamina, compuestos de fósforo con lantánidos), marcas enzimáticas (p. ej., peroxidasa de rábano picante, luciferasa, fosfatasa alcalina); marcadores quimioluminiscentes; grupos biotinilo; epítomos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un informador secundario (p. ej., secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas epítópicas); y agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio.

El término "proteína de unión conjugada" hace referencia a una proteína de unión conectada químicamente a un segundo radical químico, tal como un agente terapéutico o citotóxico. El término "agente" se utiliza en la presente memoria para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto elaborado a partir de materiales biológicos. Preferiblemente los agentes terapéuticos o citotóxicos incluyen, pero no están limitados a, toxina pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etoposido, tenoposido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracínodiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

El término "proteína de unión cristalizada" según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un polipéptido que existe en forma de un cristal. Los cristales son una forma del estado sólido de la materia, que es distinta de otras formas tales como el estado sólido amorfo o el estado cristalino líquido. Los cristales están compuestos de matrices de átomos, iones, moléculas (p. ej., proteínas tales como anticuerpos) tridimensionales, repetitivas, regulares, o ensamblajes moleculares (p. ej., complejos antígeno/anticuerpo). Estas matrices tridimensionales están dispuestas de acuerdo con relaciones matemáticas específicas que son bien conocidas en este ámbito. La unidad fundamental, o unidad estructural, que se repite en un cristal se denomina unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en un ordenamiento que conforma una simetría cristalográfica bien definida, dada proporciona la "celda unitaria" del cristal. La repetición de la celda unitaria por medio de translaciones regulares en las tres dimensiones proporciona el cristal. Véase Giege, R. y Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2^a ed., págs. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999)."

El término "polinucleótido" según se contempla en la presente memoria significa una forma polimérica de dos o más nucleótidos, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye las formas de hebra sencilla y doble de ADN pero preferiblemente es ADN de doble hebra.

El término "polinucleótido aislado" según se utiliza en la presente memoria significará un polinucleótido (p. ej., de origen genómico, ADNc, o sintético, o alguna combinación de los mismos) que, en virtud de su origen, el "polinucleótido aislado": no está asociado con todo o una porción de un polinucleótido con el que se encuentra en la naturaleza el "polinucleótido aislado"; está conectado operablemente a un polinucleótido que no está conectado en la naturaleza; o no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

Se pretende que el término "vector", según se utiliza en la presente memoria, haga referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha conectado. Un tipo de vector es un "plásmido", que hace referencia a un bucle de ADN de doble hebra circular en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que se pueden ligar segmentos de ADN en el genoma viral. Ciertos vectores son susceptibles de replicación autónoma en una célula anfitriona en la que se han introducido (p. ej., vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (p. ej., vectores de mamífero no episómicos) se pueden integrar en el genoma de una célula anfitriona después de la introducción en la célula anfitriona, y de esa manera se replican junto con el genoma del anfitrión. Por otra parte, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están conectados operablemente. Tales vectores son referidos en la presente memoria como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria, "plásmido" y "vector" se pueden utilizar indistintamente puesto que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, se pretende que la invención incluya tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (p. ej., retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados carentes de replicación), que cumplen funciones equivalentes.

El término "conectado operablemente" hace referencia a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera pretendida. Se liga una secuencia de control "conectada operablemente" a una secuencia codificante de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se logra en condiciones compatibles con las secuencias de control. Las secuencias "conectadas operablemente"

incluyen tanto las secuencias de control de la expresión que están contiguas al gen de interés como las secuencias de control de la expresión que actúan en *trans* o a una distancia para controlar el gen de interés. El término "secuencia de control de la expresión" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes a las que están ligadas. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias de inicio de la transcripción, terminación, promotoras e intensificadoras apropiadas; señales de procesamiento de ARN eficaces tales como las señales de empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico; secuencias que potencian la eficacia de la traducción (es decir, secuencia consenso de Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de las proteínas; y cuando se desee, secuencias que potencian la secreción de proteínas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo anfitrión; en procariotas, tales secuencias de control generalmente incluyen secuencias promotoras, del sitio de unión al ribosoma, y de terminación de la transcripción; en eucariotas, generalmente, tales secuencias de control incluyen secuencias promotoras y de terminación de la transcripción. Se pretende que el término "secuencias de control" incluya componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y puede incluir también componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias del compañero de fusión.

"Transformación", según se define en la presente memoria, hace referencia a cualquier procedimiento mediante el cual el ADN exógeno se introduce en una célula anfitriona. La transformación puede ocurrir en condiciones naturales o artificiales utilizando diversos métodos bien conocidos en la técnica. La transformación puede basarse en cualquier método conocido para la inserción de secuencias de ácido nucleico foráneas en una célula anfitriona procariótica o eucariótica. El método se selecciona basándose en la célula anfitriona que esté siendo transformada y puede incluir, pero no está limitado a, infección viral, electroporación, lipofección, y bombardeo de partículas. Tales células "transformadas" incluyen células transformadas establemente en las que el ADN insertado es susceptible de replicación ya sea en un plásmido de replicación autónoma o como parte del cromosoma anfitrión. También incluyen células que expresan transitoriamente el ADN o ARN insertado durante períodos de tiempo limitado.

Se pretende que el término "célula anfitriona recombinante" (o simplemente "célula anfitriona"), según se utiliza en la presente memoria, haga referencia a una célula en la que se ha introducido ADN exógeno. Se debe entender que se pretende que tales términos hagan referencia no solo a la célula sujeto concreta, sino, a la progenie de tal célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias medioambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero todavía está incluida dentro del alcance del término "célula anfitriona" según se utiliza en la presente memoria. Preferiblemente las células anfitrionas incluyen células procarióticas y eucarióticas seleccionadas entre cualquiera de los Reinos de la vida. Las células eucarióticas preferidas incluyen células protistas, fúngicas, vegetales y animales. Muy preferiblemente las células anfitrionas incluyen pero no están limitadas a la línea de células procarióticas de *E. Coli*; las líneas de células de mamífero CHO y COS; la línea de células de insecto Sf9; y la célula fúngica *Saccharomyces cerevisiae*.

Se pueden utilizar técnicas convencionales para el ADN recombinante, la síntesis de oligonucleótidos, y el cultivo y la transformación de tejidos (p. ej., electroporación, lipofección). Se pueden realizar reacciones enzimáticas y técnicas de purificación de acuerdo con las especificaciones del fabricante o según se lleva a cabo normalmente en la técnica o como se describe en la presente memoria. Las técnicas y procedimientos anteriores se pueden realizar generalmente de acuerdo con mecanismos convencionales bien conocidos en la técnica y según se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y comentan a lo largo de la presente memoria. Véase p. ej., Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)).

"Organismo transgénico", según se conoce en la técnica y según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un organismo que tienen células que contienen un transgén, donde el transgen introducido en el organismo (o un ancestro del organismo) expresa un polipéptido no expresado naturalmente en el organismo. Un "transgén" es un constructo de ADN, que es integrado establemente y operablemente en el genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla el organismo transgénico, dirigiendo la expresión de un producto génico codificado en uno o más tipos de células o tejidos del organismo transgénico.

Los términos "regular" y "modular" se utilizan indistintamente, y, según se utilizan en la presente memoria, hacen referencia a un cambio o una alteración en la actividad de una molécula de interés (p. ej., la actividad biológica de hIL-18). La modulación puede ser un aumento o disminución de la magnitud de una cierta actividad o función de la molécula de interés. Las actividades y funciones representativas de una molécula incluyen, pero no están limitadas a, características de unión, actividad enzimática, activación de receptores celulares, y transducción de la señal.

Correspondientemente, el término "modulador," según se utiliza en la presente memoria, es un compuesto capaz de cambiar o alterar una actividad o función de una molécula de interés (p. ej., la actividad biológica de hIL-18). Por ejemplo, un modulador puede ocasionar un aumento o disminución en la magnitud de una cierta actividad o función de una molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del modulador. En ciertas realizaciones, el modulador es un inhibidor, que disminuye la magnitud de al menos una actividad o

función de una molécula. Los inhibidores ilustrativos incluyen, pero no están limitados a, proteínas, péptidos, anticuerpos, cuerpos peptídicos (de Inglés: "peptibodies"), carbohidratos o moléculas orgánicas pequeñas. Los cuerpos peptídicos se describen, p. ej., en el documento WO 01/83525.

5 El término "agonista", según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés, causa un aumento en la magnitud de una cierta actividad o función de la molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del agonista. Los agonistas de interés concretos pueden incluir, pero no están limitados a, polipéptidos IL-18 o polipéptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, u otras moléculas cualesquiera que se unen a hIL-18.

10 El término "antagonista" o "inhibidor", según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés causa una disminución en la magnitud de una cierta actividad o función de la molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del antagonista. Los antagonistas de interés concretos incluyen aquellos que bloquean o modulan la actividad biológica o inmunológica de hIL-18. Los antagonistas e inhibidores de hIL-18 pueden incluir, pero no están limitados a, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, u otras moléculas cualesquiera que se unen a hIL-18.

15 El término "muestra", según se utiliza en la presente memoria, se utiliza en su sentido más amplio. Una "muestra biológica", según se utiliza en la presente memoria, incluye, pero no está limitada a, cualquier cantidad de una sustancia de un ente vivo o ente anteriormente vivo. Tales entes vivos incluyen, pero no están limitados a, seres humanos, ratones, ratas, monos, perros, conejos y otros animales. Tales sustancias incluyen, pero no están limitadas a, sangre, suero, orina, líquido sinovial, células, órganos, tejidos, médula ósea, nódulos linfáticos y bazo.

20 El término "compite" según se utiliza en la presente memoria, y según es conocido y utilizado por los profesionales expertos en la técnica, hace referencia a la capacidad de una proteína de unión para interferir con, o impedir de otro modo la unión de una segunda proteína de unión a un ligando común a ambas proteínas de unión (p. ej., IL-18). Los análisis útiles para determinar las características de competición de las proteínas de unión son bien conocidos en la técnica. Los análisis de competición preferidos se describen en la presente memoria.

30 I. Anticuerpos Humanos que se Unen a IL-18 Humana.

Un aspecto de la presente invención proporciona anticuerpo aislados humanos, o sus porciones de unión al antígeno, que se unen a IL-18 con una alta afinidad, una baja constante de desunión y una alta capacidad de neutralización. Preferiblemente, los anticuerpos, o porciones de los mismos, son anticuerpos aislados. Preferiblemente, los anticuerpos humanos de la invención son anticuerpos anti-IL-18 humanos neutralizadores.

A. Método para la elaboración de anticuerpos anti-IL-18

40 Los anticuerpos de la presente invención se pueden elaborar por medio de cualquiera de varios mecanismos conocidos en la técnica. Un método particularmente preferido para generar anticuerpos anti-IL-18 de la invención incluyen la utilización de ratones transgénicos XENOMOUSE, y la utilización de técnicas de hibridoma y manipulación celular SLAM (Abgenix, Inc., Fremont, CA) conocidas en la técnica para la preparación de anticuerpos, y la utilización de antígenos que comprenden el péptido IL-18 descrito en el Ejemplo 3.2, es decir, IL-18 humana que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO. 1 y fragmentos del mismo.

45 En una realización de la presente invención, los anticuerpos humanos son producidos inmunizando un animal no humano que comprende algo, o la totalidad, del locus de la inmunoglobulina humana con un antígeno IL-18. En una realización preferida, el animal no humano es un ratón transgénico XENOMOUSE, una cepa de ratón diseñada que comprende grandes fragmentos de los loci de inmunoglobulina humana y tiene una producción anticuerpos de ratón deficiente. Véase, p. ej., Green et al. Nature Genetics 7:13-21 (1994) y las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.916.771, 5.939.598, 5.985.615, 5.998.209, 6.075.181, 6.091.001, 6.114.598 y 6.130.364. Véanse también el documento WO 91/10741, publicado el 25 de Julio de 1991, el documento WO 94/02602, publicado el 3 de Febrero de 1994, el documento WO 96/34096 y el documento WO 96/33735, ambos publicados el 31 de Octubre de 1996, el documento WO 98/16654, publicado el 23 de Abril de 1998, el documento WO 98/24893, publicado el 11 de Junio de 1998, el documento WO 98/50433, publicado el 12 de Noviembre de 1998, el documento WO 99/45031, publicado el 10 de Septiembre de 1999, el documento WO 99/53049, publicado el 21 de Octubre de 1999, el documento WO 00 09560, publicado el 24 de Febrero de 2000 y el documento WO 00/037504, publicado el 29 de Junio de 2000. El ratón transgénico XENOMOUSE produce un repertorio humano de tipo adulto de anticuerpos completos humanos, y genera Mabs humanos específicos del antígeno. El ratón transgénico XENOMOUSE contiene aproximadamente 80% del repertorio de anticuerpos humanos a través de la introducción de fragmentos YAC de configuración de la línea germinal del tamaño de megabases de los loci de la cadena pesada y los loci de la cadena ligera x humanos. See Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156 (1997), Green y Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495 (1998).

La invención también proporciona un método para elaborar anticuerpos anti-IL-18 a partir de animales distintos de seres humanos y ratones mediante la inmunización de animales no humanos transgénicos que comprenden loci de inmunoglobulina humana. Se pueden producir tales animales utilizando los métodos descritos inmediatamente antes. Los métodos descritos en estas patentes se pueden modificar como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.994.619. En una realización preferida, los animales no humanos pueden ser ratas, ovejas, cerdos, cabras, vacas o caballos.

En otra realización, el animal no humano que comprende loci de genes de inmunoglobulina humana son animales que tienen un "minilocus" de inmunoglobulinas humanas. En el enfoque del minilocus, se imita un locus de Ig exógeno a través de la inclusión de genes individuales a partir del locus de Ig. De este modo, se forman uno o más genes V_H, uno o más genes D_H, uno o más genes J_H, una región constante mu, y una segunda región constante (preferiblemente una región constante gamma) en un constructo para su inserción en un animal. Este enfoque es descrito, *inter alia*, en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.545.807, 5.545.806, 5.625.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650, 5.814.318, 5.591.669, 5.612.205, 5.721.367, 5.789.215, y 5.643.763.

Una ventaja del enfoque del minilocus es la rapidez con la que se pueden generar e introducir constructos que incluyen porciones del locus de Ig en los animales. Sin embargo, una desventaja potencial del enfoque del minilocus es que puede no haber suficiente diversidad de inmunoglobulina para soportar el desarrollo de células B completas, de manera que puede haber menor producción de anticuerpo.

Con el fin de producir un anticuerpo humano anti-IL-18, un animal no humano que comprende algunos o todos los loci de la inmunoglobulina humana se inmuniza con un antígeno IL-18 y el anticuerpo o la célula que produce el anticuerpo son aislados del animal. El antígeno IL-18 puede ser IL-18 aislada y/o purificada y es preferiblemente una IL-18 humana. En otra realización, el antígeno IL-18 es un fragmento de IL-18, preferiblemente IL-18 madura. En otra realización, el antígeno IL-18 es un fragmento que comprende al menos un epítipo de IL-18.

La inmunización de animales se puede realizar mediante cualquier método conocido en la técnica. Véase, p. ej., Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Los métodos para la inmunización de animales no humanos tales como ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos, vacas y caballos son bien conocidos en la técnica. Véanse, p. ej., Harlow y Lane y la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.994.619. En una realización preferida, el antígeno IL-18 se administra con un coadyuvante para estimular la respuesta inmunitaria. Tales coadyuvantes incluyen coadyuvante completo o incompleto de Freund, RIBI (muramildipéptidos) o ISCOM (complejos inmunoestimuladores). Tales coadyuvantes pueden proteger el polipéptido de la dispersión rápida secuestrándolo en depósitos locales, o pueden contener sustancias que estimulen al anfitrión para que secrete factores que sean quimiotácticos para los macrófagos y otros componentes del sistema inmunitario. Preferiblemente, si se está administrando un polipéptido, el programa de inmunización implicará dos o más administraciones del polipéptido, repartidas a lo largo de varias semanas.

El Ejemplo 2.2.A proporciona un protocolo para la inmunización de un ratón transgénico XENOMOUSE con IL-18 humana en solución salina tamponada con fosfato.

B. Producción de Anticuerpos y Líneas Celulares Productoras de Anticuerpos

Después de la inmunización de un animal con un antígeno IL-18, se pueden obtener del animal anticuerpos y/o células productoras de anticuerpos. Se obtiene un suero que contiene el anticuerpo anti-IL-18 a partir del animal desangrando o sacrificando el animal. El suero se puede utilizar a medida que se obtiene del animal, se puede obtener una fracción de inmunoglobulina del suero, o los anticuerpos anti-IL-18 se pueden purificar a partir del suero. El suero o las inmunoglobulinas obtenidos de esta manera son policlonales, teniendo de esta modo un conjunto heterogéneo de propiedades.

En otra realización, se pueden preparar hibridomas inmortalizados productores de anticuerpos a partir del animal inmunizado. Después de la inmunización, el animal se sacrifica y las células B esplénicas se fusionan con células de mieloma inmortalizadas como es bien conocido en la técnica. Véase, p. ej., Harlow y Lane, *supra*. En una realización preferida, las células de mieloma no secretan polipéptidos de inmunoglobulina (una línea celular no secretora). Después de la fusión y la selección con antibiótico, los hibridomas se escrutan utilizando IL-18, o una porción de la misma, o una célula que expresa IL-18. En una realización preferida, el escrutinio inicial se realiza utilizando un inmunoanálisis con enzima ligada (ELISA) o un radioinmunoanálisis (RIA), preferiblemente un ELISA. Un ejemplo de escrutinio mediante ELISA se proporciona en el documento WO 00/37504.

Los hibridomas que producen el anticuerpo anti-IL-18 se seleccionan, se clonan y se escruta adicionalmente para determinar las características deseables, incluyendo crecimiento robusto del hibridoma, alta producción de anticuerpo y características deseables del anticuerpo, como se comenta adicionalmente más abajo. Los hibridomas se pueden cultivar y expandir in vivo en animales singenéticos, en animales que carecen de sistema inmunitario, p.

ej., ratones atímicos, o en cultivo celular *in vitro*. Los métodos para seleccionar, clonar y expandir hibridomas son bien conocidos por los expertos normales en la técnica.

Preferiblemente, el animal inmunizado es un animal no humano que expresa los genes de la inmunoglobulina humana y las células B esplénicas se fusionan a un mieloma derivado de la misma especie que el animal no humano. Más preferiblemente, el animal inmunizado es un ratón transgénico XENOMOUSE y la línea celular de mieloma es un mieloma de ratón no secretor, tal como línea celular de mieloma P3X63Ag8.653 (véase, p. ej., el Ejemplo 2.2.B).

En un aspecto, la invención proporciona hibridomas que producen anticuerpos anti-IL-18 humanos. En una realización preferida, los hibridomas son hibridomas ratón, como se ha descrito anteriormente. En otra realización preferida, los hibridomas son producidos en una especie distinta del ser humano y del ratón tal como ratas, ovejas, cerdos, cabras, vacas o caballos. En otra realización, los hibridomas son hibridomas humanos, en los que se fusiona un mieloma no secretor humano con una célula humana que expresa un anticuerpo anti-IL-18.

En otro aspecto de la invención, se generan anticuerpos recombinantes a partir de linfocitos aislados, individuales utilizando a procedimiento referido en la técnica como método del anticuerpo linfocítico seleccionado ("SLAM" por sus siglas Inglesas), como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.627.052, La Publicación PCT WO 92/02551 y Babcock, J.S. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848. En éste método, las células individuales que secretan los anticuerpos de interés, p. ej., linfocitos derivados uno cualquiera de los animales inmunizados descritos en la Sección I (A), se escrutan utilizando un análisis en placa hemolítica específico del antígeno, donde el antígeno IL-18, o un fragmento del mismo, se acopla a glóbulos rojos de oveja utilizando un conector, tal como la biotina, y se utiliza para identificar células individuales que secretan anticuerpos con especificidad para IL-18. Después de la identificación de las células que secretan el anticuerpo de interés, los ADNc de la región variable de la cadena pesada y ligera se rescatan de las células por medio de PCR con transcriptasa inversa y estas regiones variables se pueden expresar a continuación, en el contexto de las regiones constantes de inmunoglobulina apropiadas (p. ej., regiones constantes humanas), en células anfitrionas de mamífero, tales como células COS o CHO. Las células anfitrionas transfectadas con las secuencias de inmunoglobulina amplificadas, derivadas de linfocitos seleccionados *in vivo*, pueden experimentar a continuación análisis y selección *in vitro* adicionales, por ejemplo por medio de inmunopurificación de las células transfectadas para aislar las células que expresan los anticuerpos para IL-18. Las secuencias de inmunoglobulina amplificadas se pueden manipular adicionalmente *in vitro*, por ejemplo mediante métodos de maduración de afinidad *in vitro* tales como los descritos en la Publicación PCT WO 97/29131 y la Publicación PCT WO 00/56772.

Los métodos *in vitro* también se pueden utilizar para elaborar los anticuerpos de la invención, donde una genoteca de anticuerpos se escruta para identificar un anticuerpo que tiene la especificidad de unión deseada. Los métodos para tal escrutinio de genotecas de anticuerpos recombinantes son bien conocidos en la técnica e incluyen los métodos descrito, por ejemplo, por Ladner et al. la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.223.409; Kang et al. Publicación PCT Núm. WO 92/18619; Dower et al. Publicación PCT Núm. WO 91/17271; Winter et al. Publicación PCT Núm. WO 92/20791; Markland et al. Publicación PCT Núm. WO 92/15679; Breiting et al. Publicación PCT Núm. WO 93/01288; McCafferty et al. Publicación PCT Núm. WO 92/01047; Garrard et al. Publicación PCT Núm. WO 92/09690; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay et al. (1992) Hum Antibod Hibridomas 3:81-85; Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281; McCafferty et al., Nature (1990) 348:552-554; Griffiths et al. (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins et al. (1992) J Mol Biol 226:889-896; Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; Gram et al. (1992) PNAS 89:3576-3580; Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; y Barbas et al. (1991) PNAS 88:7978-7982, la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos Núm. 20030186374, y la Publicación PCT Núm. WO 97/29131.

La genoteca de anticuerpos recombinantes puede ser de un sujeto inmunizado con IL-18, o una porción de IL-18. Alternativamente, la genoteca de anticuerpos recombinantes puede ser de un sujeto no sometido a tratamiento previo, es decir, uno que no ha sido inmunizado con IL-18, tal como una genoteca de anticuerpos humanos de un sujeto humano que no ha sido inmunizado con IL-18 humana. Los anticuerpos de la invención se seleccionan escrutando la genoteca de anticuerpos recombinantes con el péptido que comprende IL-18 humana (p. ej., un péptido que corresponde a una porción de hIL-18) para seleccionar de ese modo los anticuerpos que reconocen IL-18. Los métodos para llevar a cabo tal escrutinio y selección son bien conocidos en la técnica, tales como los descritos en las referencias del párrafo anterior. Para seleccionar anticuerpos de la invención que tienen afinidades de unión concretas por hIL-18, tales como aquellos que se disocian de IL-18 humana con una constante de desunión k_{off} concreta, se puede utilizar el método de resonancia de plasmón superficial para seleccionar anticuerpos que tienen la constante de desunión k_{off} deseada. Para seleccionar anticuerpos de la invención que tienen una actividad neutralizadora concreta para hIL-18, tales como aquellos con una CI_{50} concreta, se pueden utilizar métodos convencionales conocidos en la técnica para la evaluación de la inhibición de la actividad de hIL-18.

En un aspecto, la invención tiene que ver con un anticuerpo aislado, o una porción de unión al antígeno del mismo, que se une a IL-18 humana. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo neutralizador. Preferiblemente, el

anticuerpo es un anticuerpo humano. En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante o un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo neutralizador de la invención más preferido es referido en la presente memoria como 2.5(E) y tiene VL con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 7 y VH con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 6. Muy preferiblemente, el anticuerpo 2.5(E) se une a IL-18 humana con una K_d de menos de 5×10^{10} M (véase el Ejemplo 2.2.F).

Preferiblemente, los anticuerpos anti-IL-18 de la presente invención, tales como el anticuerpo 2.5(E) y anticuerpos relacionados, muestran la capacidad de reducir o neutralizar la actividad de IL-18, p. ej., como se evalúa mediante uno cualquiera de los diversos análisis in vitro e in vivo conocidos en la técnica (p. ej., véase el Ejemplo 3.2.F). Por ejemplo, estos anticuerpos neutralizan producción inducida por IL-18 de interferón gamma humano en KG-1 células con valores de CI_{50} en el intervalo de al menos alrededor de 10^{-8} M, alrededor de 10^{-9} M, o alrededor de 10^{-10} M. Adicionalmente estos anticuerpos también neutralizan la producción inducida por IL-18 de interferón gamma humano en células de sangre completa con valores de CI_{50} en el intervalo de al menos alrededor de 10^{-8} M, alrededor de 10^{-9} M, o alrededor de 10^{-10} M.

En una realización particularmente preferida el anticuerpo anti-IL-18 2.5(E) se une a IL-18 humana en diversas formas, incluyendo pro-IL-18, IL-18 madura y IL-18 truncada. El anticuerpo 2.5(E) no se une específicamente a otras citoquinas, tales como IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-21, TNF, LT (linfotóxica), $LT\alpha 1\beta 2$, y $LT\alpha 2\beta 1$. Sin embargo, el anticuerpo 2.5(E) no exhibe reactividad cruzada con IL-18 de otras especies. Por ejemplo, el anticuerpo neutraliza la actividad de IL-18 de mono cinomolgus (CI_{50} para IL-18 cino = $9,1E \times 10^{-11}$; Véase el Ejemplo 2.2.J1).

En un aspecto, la invención tiene que ver con los anticuerpos 2.5(E) y las porciones funcionales de los anticuerpos, anticuerpos relacionados con 2.5(E) y las porciones funcionales de los anticuerpos, y otros anticuerpos humanos y las porciones funcionales de los anticuerpos con propiedades equivalentes a 2.5(E), tales como alta afinidad de unión por IL-18 con bajas cinéticas de disociación y alta capacidad neutralizadora. En realizaciones preferidas, el anticuerpo aislado, o porción de unión al antígeno del mismo, se une a IL-18 humana, donde el anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, se disocia de IL-18 humana con una constante de desunión k_{off} de alrededor de $0,1s^{-1}$ o menos, según se determina mediante resonancia de plasmón superficial, o que inhibe la actividad humana de IL-18 con una CI_{50} de alrededor de 1×10^{-6} M o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, pueden disociarse de IL-18 humana con una constante de desunión K_{off} de alrededor de $1 \times 10^{-2}s^{-1}$ o menos, según se determina mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad humana de IL-18 con una CI_{50} de alrededor de 1×10^{-7} M o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, pueden disociarse de IL-18 humana con una constante de desunión K_{off} de alrededor de $1 \times 10^{-3}s^{-1}$ o menos, según se determina mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad humana de IL-18 con una CI_{50} de alrededor de 1×10^{-7} M o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, pueden disociarse de IL-18 humana con una constante de desunión K_{off} de alrededor de $1 \times 10^{-4}s^{-1}$ o menos, según se determina mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad humana de IL-18 con una CI_{50} de alrededor de 1×10^{-9} M o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, pueden disociarse de IL-18 humana con una constante de desunión K_{off} de alrededor de $1 \times 10^{-5}s^{-1}$ o menos, según se determina mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad humana de IL-18 con una CI_{50} de alrededor de 1×10^{-10} M o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, pueden disociarse de IL-18 humana con una constante de desunión K_{off} de alrededor de $1 \times 10^{-5}s^{-1}$ o menos, según se determina mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad humana de IL-18 con una CI_{50} de alrededor de 1×10^{-11} M o menos.

En otra realización más, la invención proporciona un anticuerpo aislado humano, o una porción de unión al antígeno del mismo, con una región variable de la cadena ligera (V_L) que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 7, y una región variable de la cadena pesada (V_H) que comprende una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 6.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, tal como una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. Preferiblemente, la región constante de la cadena pesada es una región constante de la cadena pesada de IgG1 o una región constante de la cadena pesada de IgG4. Además, el anticuerpo puede comprender una región constante de la cadena ligera, o una región constante de la cadena ligera kappa o una región constante de la cadena ligera lambda. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena ligera kappa. Alternativamente, la porción de anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab o un fragmento Fv de cadena sencilla.

La reposición de residuos de aminoácidos en la porción Fc para alterar la función efectora del anticuerpo es conocida en la técnica (Winter, et al. Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.648.260; 5.624.821). La porción Fc de un anticuerpo media algunas funciones efectoras importantes p. ej. inducción de citoquinas, ADCC, fagocitosis, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y vida media/velocidad de aclaramiento del anticuerpo y de los complejos antígeno-anticuerpo. En algunos casos esas funciones efectoras son deseables para el anticuerpo

5 terapéutico pero en otros casos podría ser innecesario o incluso perjudicial, dependiendo de los objetivos terapéuticos. Ciertos isotipos de IgG humanas, particularmente IgG1 e IgG3, median la ADCC y la CDC a través de la unión a FcγRs y al complemento C1q, respectivamente. Los receptores neonatales de Fc (FcRn) son los componentes críticos que determinan la vida media de los anticuerpos circulantes. En otra realización más se
10 reemplaza al menos un residuo de aminoácido en la región constante del anticuerpo, por ejemplo la región Fc del anticuerpo, de manera que se alteran las funciones efectoras del anticuerpo.

15 Una realización proporciona una proteína de unión marcada donde un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención es derivatizado o conectado a otra molécula funcional (p. ej., otro péptido o proteína). Por ejemplo, una proteína de unión marcada de la invención se puede obtener conectando funcionalmente un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención (mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más entidades moleculares diferentes, tales como otro anticuerpo (p. ej., un anticuerpo biespecífico o un fragmento bivalente), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puedan mediar la asociación del anticuerpo o porción de anticuerpo con otra molécula (tal como una región central de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina).

20 Los agentes detectables útiles con los que se puede derivatizar un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención incluyen compuestos fluorescentes. Los agentes detectables fluorescentes ilustrativos incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamino-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina y similares. Un anticuerpo también se puede derivatizar con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa y similares. Cuando un anticuerpo es derivatizado con una enzima detectable, ésta se detecta añadiendo reactivos adicionales que utiliza la enzima para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando el agente detectable peroxidasa de rábano picante está presente, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobenzidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es
25 detectable. También se puede derivatizar un anticuerpo con biotina, y detectar a través de la medición indirecta de unión de avidina o estreptavidina.

30 Otra realización de la invención proporciona una proteína de unión cristalizada. Preferiblemente la invención se refiere a cristales de anticuerpos anti-IL-18 completos y fragmentos del mismo como se describe en la presente memoria, y formulaciones y composiciones que comprenden tales cristales. En una realización la proteína de unión cristalizada tiene una vida media in vivo superior a la de la contraparte soluble de la proteína de unión. En otra realización la proteína de unión conserva la actividad biológica después de la cristalización.

35 La proteína de unión cristalizada de la invención se puede producir de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y como se describe en el documento WO 02072636. (Véase también el Ejemplo 2.2.M)

40 Otra realización de la invención proporciona una proteína de unión glicosilada donde el anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo comprende uno o más residuos de carbohidrato. La producción de proteína incipiente in vivo puede experimentar una transformación adicional, conocida como modificación post-traducciona. En particular, se pueden añadir enzimáticamente residuos de azúcar (glicosilo), un procedimiento conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes que portan cadenas laterales de oligosacáridos conectadas covalentemente son conocidas como proteínas glicosiladas o glicoproteínas. Las glicosilación de proteínas depende de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, así como a la célula anfitriona en la que se expresa la proteína. Diferentes organismos pueden producir diferentes enzimas de glicosilación (p. ej., glicosiltransferasas y glicosidasas), y tienen diferentes sustratos (azúcares nucleotídicos) disponibles. Debido a tales factores, el patrón de glicosilación de proteínas, y la composición de residuos de glicosilo, puede diferir dependiendo del sistema anfitrión en el que se expresa la proteína concreta. Los residuos de glicosilo útiles en la invención pueden incluir, pero no están limitados a, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, n-acetilglucosamina y ácido siálico. Preferiblemente la proteína de unión glicosilada comprende residuos de glicosilo de manera que el patrón de glicosilación es humano.

50 Es conocido por los expertos en la técnica que diferente glicosilación de proteínas puede dar como resultado diferentes características de la proteína. Por ejemplo, la eficacia de una proteína terapéutica producida en un microorganismo anfitrión, tal como levadura, y glicosilada utilizando la ruta endógena de la levadura se puede reducir en comparación con la de la misma proteína expresada en una célula de mamífero, tal como una línea de células CHO. Tales glicoproteínas pueden ser también inmunogénicas en seres humanos y muestran una vida media reducida tras la administración in vivo. Los receptores específicos en seres humanos y otros animales pueden reconocer residuos de glicosilo específicos y promover el rápido aclaramiento de la proteína del torrente sanguíneo. Otros efectos adversos pueden incluir cambios en el plegamiento de la proteína, solubilidad, susceptibilidad a proteasas, tráfico, transporte, compartimentalización, secreción, reconocimiento por otras proteínas o factores, antigenicidad, o alergenicidad. Por lo tanto, un especialista en medicina puede preferir una proteína terapéutica con una composición y patrón de glicosilación específicos, por ejemplo composición y patrón de glicosilación idénticos, o al menos similares, al producido en células humanas o en las células específicas de la especie del animal sujeto deseado.

Se puede lograr la expresión de proteínas glicosiladas diferentes de las de la célula anfitriona modificando genéticamente la célula anfitriona para que exprese enzimas de glicosilación heterólogas. Utilizando mecanismos conocidos en la técnica un especialista en medicina puede generar anticuerpos o sus porciones de unión al antígeno que exhiben glicosilación de proteínas humanas. Por ejemplo, se han modificado genéticamente cepas de levadura para que expresen enzimas de glicosilación de origen no natural de manera que las proteínas glicosiladas (glicoproteínas) producidas en estas cepas de levadura muestren una glicosilación de proteínas idéntica a la de las células animales, especialmente células humanas (solicitudes de patente de los Estados Unidos Núms. 20040018590 y 20020137134).

Adicionalmente, un experto en la técnica apreciará que se puede expresar una proteína de interés utilizando una genoteca de células anfitrionas diseñadas genéticamente para expresar diversas enzimas de glicosilación, de manera que las células anfitrionas miembro de la genoteca producen la proteína de interés con patrones de glicosilación variantes. Un especialista en medicina puede seleccionar y aislar a continuación la proteína de interés con patrones de glicosilación novedosos concretos. Preferiblemente, la proteína que tiene un patrón de glicosilación novedoso seleccionado particularmente exhibe propiedades biológicas mejoradas o alteradas.

C. Producción de anticuerpos IL-18 recombinantes

Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir por medio de una variedad de mecanismos conocidos en la técnica. Por ejemplo, expresión a partir de células anfitrionas, donde el vector o los vectores de expresión que codifican las cadenas ligera y pesada es o son transfectados a una célula anfitriona mediante técnicas convencionales. Se pretende que las diversas formas del término "transfección" abarquen una amplia variedad de técnicas utilizadas comúnmente para la introducción de ADN exógeno en una célula anfitriona procariótica o eucariótica, *p. ej.*, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección por DEAE-dextrano y similares. Si bien es posible expresar los anticuerpos de la invención en células anfitrionas tanto procarióticas como eucarióticas, es preferible la expresión de anticuerpos en célula eucarióticas, y muy preferible células anfitrionas de mamífero, puesto que es más probable que tales células eucarióticas (y en particular la células de mamífero) más que las procarióticas ensamblen y secreten un anticuerpo plegado apropiadamente e inmunológicamente activo.

Las células anfitrionas de mamífero preferidas para la expresión de los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen Ovario de Hámster Chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas por Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, usadas con un marcador seleccionable para DHFR, *p. ej.*, como describen R.J. Kaufman y P.A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifica anticuerpo genes se introducen en células anfitrionas de mamífero, los anticuerpos son producidos cultivando las células anfitrionas durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células anfitrionas o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que crecen las células anfitrionas. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo utilizando métodos de purificación de proteína convencionales.

También se pueden usar células anfitrionas para producir fragmentos funcionales de anticuerpos, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entenderá que las variaciones del procedimiento anterior se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula anfitriona con ADN que codifica fragmentos funcionales de la cadena ligera y/o la cadena pesada de un anticuerpo de esta invención. También se puede utilizar tecnología de ADN recombinante para eliminar algo, o todo, el ADN que codifica cualquiera o ambas cadenas ligera y pesada que no es necesario para unirse a los antígenos de interés. Las moléculas expresadas a partir de tales moléculas de ADN truncadas están también abarcadas por los anticuerpos de la invención. Además, se pueden producir anticuerpos bifuncionales en los que una cadena pesada y una ligera son un anticuerpo de la invención y la otra cadena pesada y ligera son específicas para un antígeno distinto de los antígenos de interés mediante entrecruzamiento de un anticuerpo de la invención con un segundo anticuerpo mediante métodos de entrecruzamiento químico convencionales.

En un sistema preferido para la expresión recombinante de un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de la invención, se introduce un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo en - células CHO dhfr por medio de transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de la cadena pesada y ligera del anticuerpo se conectan operativamente a elementos reguladores potenciadores de CMV/promotores de AdMLP para dirigir los altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen de DHFR, que permite la selección de las células CHO que han sido transfectadas con el vector utilizando selección/amplificación con metotrexato. Las células anfitrionas transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera del medio de cultivo. Se utilizan técnicas de biología molecular convencionales para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células anfitrionas, seleccionar los transformantes, cultivar las células anfitrionas y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. La invención proporciona también adicionalmente un método para sintetizar un anticuerpo recombinante de la invención cultivando una célula anfitriona de la invención en un medio de cultivo

adecuado hasta que se sintetice un anticuerpo recombinante de la invención. El método puede comprender adicionalmente el aislamiento de anticuerpo recombinante del medio de cultivo.

5 La Tabla 1 es una lista de secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de anticuerpos anti-hIL-18 de la descripción. En la región VH, el aminoácido de origen natural de la posición 1 del extremo amino (extremo N) es o bien Glutamato (E) o bien Glutamina (Q). Sin embargo, para generar una proteína recombinante con extremos N homogéneos durante la producción de proteína a gran escala que comprende la región VH, se prefiere Glutamato (E) en la posición 1 del extremo N.

10

Tabla 1 Lista de las Secuencias de Aminoácidos de las regiones VH y VL

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia 12345678901234567890
Región de la proteína		
VH 2.5(E)	SEQ ID NO: 6	EVQLVQSGTEVKKPGESLKI SCKGSGYIVTTSYWIGWVRQM PGKGLEWMGFIYPGDSETRY SPTFQGGQVTFISADKSFNTAF LQWSSLKASDTAMYICARVG SGWYPYTFDIWGQGTMTVTS S
VH 2.5 CDR-H1	Residuos 31-35 del SEQ ID NO: 6	SYWIG
VH 2.5 CDR-H2	Residuos 50-66 del SEQ ID NO: 6	FIYPGDSETRYSPTFQG
VH 2.5 CDR-H3	Residuos 99-110 del SEQ ID NO: 6	VGSGWYPYTFDI
VL 2.5(E)	SEQ ID NO: 7	EIVMTQSPATLSVSPGERAT LSCRASESISSNLAWYQOKP GQAPRLFITYTASTRATDIPA RFSGSGSGTEFTLTISLQS EDFAVYYCQQYNNWPSITFG QQTRLEIKR
VL 2.5 CDR-L1	Residuos 24-34 del SEQ ID NO: 7	RASESISSNLA
VL 2.5 CDR-L2	Residuos 50-56 del SEQ ID NO: 7	TASTRAT
VL 2.5 CDR-L3	Residuos 89-98 del SEQ ID NO: 7	QQYNNWPSIT
VH 2.13	SEQ ID NO: 8	QVQLQESGPGLVTPSQTLSL TCTVSGGSISSGGHYWTWIR QHPPKGLEWIGYIYYSGSTY YNPSLKSRLTISVDTSKNQF SLKLSSVAAADTAVYYCARD RGGSGSYWDYWGQGTLVTVS S
VH 2.13 CDR-H1	Residuos 31-37 del SEQ ID NO: 8	SGGHYWT
VH 2.13 CDR-H2	Residuos 52-67 del SEQ ID NO: 8	YIYYSGSTYYNPSLKS
VCH 2.13 CDR-H3	Residuos 100-110 del SEQ ID NO: 8	DRGGSGSYWDY

ES 2 385 484 T3

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia 12345678901234567890
Región de la proteína		
VL 2.13	SEQ ID NO: 9	EIVLTQSPGTL SL SPGERAT L LSCRGSRSVSSGYLAWYQQK PGQAPRLLIYGV S I R ATGIP DRFSGSGSGTDF TL TISRLE PEDFAVYYCQQYHGSPLTFG GGTKVEIKR
VL 2.13 CDR-L1	Residuos 24-35 del SEQ ID NO: 9	RGSRSVSSGYLA
VL 2.13 CDR-L2	Residuos 21-27 del SEQ ID NO: 9	GV S I R AT
VL 2.13 CDR-L3	Residuos 90- 98 del SEQ ID NO: 9	QQYHGSPLT
VH 23	SEQ ID NO: 10	<u>Q</u> VQLQESGPGLVK P SETL SL TCTVSGGSIRNY Y WSWIRQP PGKGLEWVGYIYSSG S TNYN PSLKSRVTISVD T SKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARDRG GASFFDYWGQGLVTVSS
VH 2.3 CDR-H1	Residuos 31-35 del SEQ ID NO: 10	NYYWS
VH 2.3 CDR-H2	Residuos 50-65 del SEQ ID NO: 10	YIYSSG S TNYNPSLKS
VH 2.3 CDR-H3	Residuos 98-107 del SEQ ID NO: 10	DRGGASFFDY
VL 2.3	SEQ ID NO: 11	DIQMTQSPSSLSASIGDRVT ITCRASQIIGGYLNWYQRP GKAPKFLIYSTSILQSGVPS RFSGSGSGTDF TL TISSLQP EDFATYYCQQTYITPPTFGP GTKVDIKR
VL 2.3 CDR-L1	Residuos 24-34 del SEQ ID NO: 11	RASQIIGGYLN
VL 2.3 CDR-L2	Residuos 50-56 del SEQ ID NO: 11	STSILQS
VL 2.3 CDR-L3	Residuos 89-97 del SEQ ID NO: 11	QQTYITPPT
VH 215	SEQ ID NO: 12	<u>Q</u> VQLQESGPGLVK P SQTL SL TCTVSGGSINSGDY Y WSWIR QH P GKGLEWIGHISYRG T TY YNPSLKSRVTISVD T SKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARD RGGGFFDLWGRGTLVTVSS
VH 215 CDR-H1	Residuos 31-37 del SEQ ID NO: 12	SGDYYS
VH 215 CDR-H2	Residuos 52-67 del SEQ ID NO: 12	HISYRG T TYYNPSLKS

ES 2 385 484 T3

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia 12345678901234567890
Región de la proteína		
VH 215 CDR-H3	Residuos 100-108 del SEQ ID NO: 12	DRGGGFFDL
VL 215	SEQ ID NO: 13	EIVLTQSPGTL^SSLSPGERAT LSCRASRSLSSGYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASIRATGIP DRFSGSGSATDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYNYSP^LTFG GGTRVEINR
VL 215 CDR-L1	Residuos 24-35 del SEQ ID NO: 13	RASRSLSSGYLA
VL 215 CDR-L2	Residuos 51-57 del SEQ ID NO: 13	GASIRAT
VL 215 CDR-L3	Residuos 90-98 del SEQ ID NO: 13	QQYNYSP ^L T
VH 231	SEQ ID NO: 14	EVQLVESGGSVQPRGSLRL SCAASGFTFSSYSMNWVROA PGKGLEWVSYFSSSGGIYY ADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMN^SLRDEDTAVYYCARD SSGYYPYFFDYWGQGLVTV SS
VH 231 CDR-H1	Residuos 31-35 del SEQ ID NO: 14	YSYMN
VH 231 CDR-H2	Residuos 50-66 del SEQ ID NO: 14	YFSSSGGIYYADSVKG
VH 231 CDR-H3	Residuos 99-111 del SEQ ID NO: 14	DDSSGYYPYFFDY
VL 231	SEQ ID NO: 15	DIVMTQSPD^SSLAVSLGERAT INCKSSQTVLYRSNNKNYLA WYQQKSGQPPKLLIYWASTR ESGVPDRFSGSGSGTDFTLT ISSLQAEDVAVYYCQQY^ST PLTFGGG^TKVEIKR
VL 231 CDR-L1	Residuos 24-40 del SEQ ID NO: 15	KSSQTVLYRSNNKNYLA
VL 231 CDR-L2	Residuos 56-62 del SEQ ID NO: 15	WASTRES
VL 231 CDR-L3	Residuos 95-103 del SEQ ID NO: 15	QQY ^S TPLT
VH 251	SEQ ID NO: 16	QLQLQESGPGLVK^PSETLSL TCTVSGGSISSRVYYWGWR QPPKGLEWIGSIYYSGSTY YNPSL^KSRVTISVDASKNQF SLKLSSVTAADTAIYYCARE DSSAWVFEHWGQGLVTVSS

ES 2 385 484 T3

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia 12345678901234567890
Región de la proteína		
VH 251 CDR-H1	Residuos 31-37 del SEQ ID NO: 16	SRVYYWG
VH 251 CDR-H2	Residuos 52-67 del SEQ ID NO: 16	SIYYSGSTYYNPSLKS
VH 251 CDR-H3	Residuos 100-109 del SEQ ID NO: 16	EDSSAWVFEH
VL 251	SEQ ID NO: 17	EIVLTQSPDTLSLSPGERAT LSCRASHILSRNYLAWYQOK PGQAPRLLMYGISIRATGIP DRFSGSGSGADFTLTINRLE PEDFAVYYCQHYDNSLCSFG QGTKLEVKR
VL 251 CDR-L1	Residuos 24-35 del SEQ ID NO: 17	RASHILSRMYLA
VL 251 CDR-L2	Residuos 51-57 del SEQ ID NO: 17	GISIRAT
VL 251 CDR-L3	Residuos 90-98 del SEQ ID NO: 17	QHYDNSLCS
VH 268	SEQ ID NO: 18	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCAASGFTFRNYGLHWVRQA PGKGLEWVAVIWYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCARES YYYYGMDVWGQGTITVTVSS
VH 268 CDR-H1	Residuos 31-35 del SEQ ID NO: 18	NYGLH
VH 268 CDR-H2	Residuos 20-36 del SEQ ID NO: 18 8	VIWYDGSNKYYADSVKG
VH 268 CDR-H3	Residuos 99-108 del SEQ ID NO: 18	ESYYYYGMDV
VL 268	SEQ ID NO: 19	EIVMTQSPATLSVSPGERAT LSCRASQSFNSNLVWYQOKP GQAPRLLIYGASTRATGIPA RFSGSGSGTEFTLTISLQS EDFAVYYCQYNNWTWTFGQ GTKVEIKR
VL 268 CDR-L1	Residuos 24-34 del SEQ ID Neo.: 19	RASQSFNSNLV
VL 268 CDR-L2	Residuos 50-56 del SEQ ID NO: 19	GASTRAT
VL 268 CDR-L3	Residuos 89-97 del SEQ ID NO: 19	QYNNWTWT

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia 12345678901234567890
Región de la proteína		
VH 336	SEQ ID NO: 20	QVQLQESGPGLVKPSQTLSSL TCTVSGGSINSGDYYSWIR QHPGKGLEWIGHISYRGTTY YNPSLKSRTVISVDTSKNQF SLKLSVTAADTAVYCCARD RGGGFFDLWGRGTLTVSS
VH 336 CDR-H1	Residuos 31-35 del SEQ ID NO: 20	SGDYYS
VH 336 CDR-H2	Residuos 52-67 del SEQ ID NO: 20	HISYRGTTYYNPSLKS
VH 336 CDR-H3	Residuos 100-108 del SEQ ID NO: 20	DRGGGFFDL
VL 336	SEQ ID NO: 21	EIVLTQSPGTLSSLSPGERAT LSCRASQSVSSGYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASIRATGIP DRFSGSGSATDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGYSPFTFG GGTRVEINR
VL 336 CDR-L1	Residuos 24-35 del SEQ ID NO: 21	RASQSVSSGYLA
VL 336 CDR-L2	Residuos 51-57 de SEQ ID NO: 21	GASIRAT
VL 336 CDR-L3	Residuos 90-98 del SEQ ID NO: 21	QQYGYSPFT
VH 351	SEQ ID NO: 22	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCAASGFTFSHYGMHWVRQA PGKGLEWVAVISYDGRNKYY VDSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVFYCAREK GGSGWPPFYYYYGMDVWGQG TITVTSS
VH 351 CDR-H1	Residuos 31-35 del SEQ ID NO: 22	HYGMH
VH 351 CDR-H2	Residuos 50-66 del SEQ ID NO: 22	VISYDGRNKYYVDSVKG
VH 351 CDR-H3	Residuos 99-116 del SEQ ID NO: 22	EKGGSGWPPFYYYYGMDV
VL 351	SEQ ID NO: 23	DIVMTQTPLSLSVTPGQPAS ISCKSSQNLLYSDGETYLCW YLQKPGQPPQLLIYEVSNR SGVPERFSGSGSDFTLKI SRVEAEDVGIYYCMQNVQLP LTFGGGTRVEIKR
VL 351 CDR-L1	Residuos 24-39 del SEQ ID NO: 23	KSSQNLLYSDGETYLC
VL 351 CDR-L2	Residuos 55-61 del SEQ ID NO: 23	EVSNRFS

ES 2 385 484 T3

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia 12345678901234567890
Región de la proteína		
VL 351 CDR-L3	Residuos 94-102 del SEQ ID NO: 23	MQNVQLPLT
VH 413	SEQ ID NO: 24	<u>QTQLQESGPGLVKPSSETLSL</u> TCTVSGGSISSRVYYGWIR QPPGKGLEWIGSIYYSGSTY YSPSLKSRVTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAIYYCARE DSSAWVFEHWGQGLVTVSS
VH 413 CDR-H1	Residuos 31-37 del SEQ ID NO: 24	SRVYYWG
VH 413 CDR-H2	Residuos 52-67 del SEQ ID NO: 24	SIYYSGSTYYSPSLKS
VH 413 CDR-H3	Residuos 100-109 del SEQ ED NO.:24	EDSSAWVFEH
VL 413	SEQ ID NO: 25	<u>EIVLTQSPDTLSLSPGERAT</u> LSCRASQILSRNYLAWYQOK PGQAPRLLIYGISIRATGIP DRFSGSGSGADFTLTINRLE PEDFAVYYCQHYDNSLCSFG QGTKLEVKKR
VL 413 CDR-L1	Residuos 24-35 del SEQ ID NO: 25	RASQILSRNYLA
VL 413 CDR-L2	Residuos 51-57 del SEQ ID NO: 25	GISIRAT
VL 413 CDR-L3	Residuos 90-98 del SEQ ID NO: 25	QHYDNSLCS
VH 435	SEQ ID NO: 26	<u>QLQLQESGPGLVKPSSETLSL</u> TCTVSGGSIDSRIYYGWIR QPPGKGLEWIGSIYYRGSTY YNPSLKSRVTISVDTPKNQF SLKLNSVTAADTAVYYCARE DSSAWVFDYWGQGLATVSS
VH 435 CDR-H1	Residuos 31-37 del SEQ ID NO: 26	SRIYYWG
VH 435 CDR-H2	Residuos 52-67 del SEQ ID NO: 26	SIYYRGSTYYNPSLKS
VH 435 CDR-H3	Residuos 100-109 del SEQ ID NO: 26	EDSSAWVFDY
VL 435	SEQ ID NO: 27	<u>EIVLTQSPGTLSSLSPGERAT</u> LSCRASQSVRNYYLNWYQOK PGQAPRLLIYGAFSRATGIP DRFSGSGSGTDFLTITSSLE PEDFVVYYCQYQNSIDSF QGTKLEINR
VL 435 CDR-L1	Residuos 24-35 del SEQ ID NO: 27	RASQSVRNYYLN

ES 2 385 484 T3

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia 12345678901234567890
Región de la proteína		
VL435 CDR-L2	Residuos 51-57 del SEQ ID NO: 27	GΔFSRAT
VL 435 CDR-L3	Residuos 90-98 del SEQ ID NO: 27	QYGN SIDS
VH 444	SEQ ID NO: 28	<u>QVQLQESGPGLVKPSQTL</u> TCTVSGGSINSGDYWSYIR QHPGKGLEWIGHISYRGTTY YNPSLKSRVTISVDTSKNQF SLKLSVTAADTAVYCCARD RGGGF FDL WGRGTLVTVSS
VH 444 CDR-H1	Residuos 31-37 del SEQ ID NO: 28	SGDYYS
VH 444 CDR-H2	Residuos 52-67 del SEQ ID NO: 28	HISYRGTTYNPSLKS
VH 444 CDR-H3	Residuos 100-108 del SEQ ID NO: 28	DRGGGFFDL
VL 444	SEQ ID NO: 29	<u>EIVLTQSPGTL</u> LSCRASQSVSSGYLAWYQRK PGQAPRLLIYGTSIRATGIP DRFSGSGSATDFTLSISRLG PEDFAVYYCQYGYSP FT FG GGTRVEINR
VL 444 CDR-L1	Residuos 24-35 del SEQ ID NO: 29	RASQSVSSGYLA
VL 444 CDR-L2	Residuos 51-57 del SEQ ID NO: 29	GTSIRAT
VL 444 CDR-L3	Residuos 90-98 del SEQ ID NO: 29	QYGYSP FT
VH 478	SEQ ID NO: 30	<u>QVQLQESGPGLVKPSQTL</u> TCTVSGGSISSGGHYWSWIR QHPGKGLEWIGYIYSGSTH YNPSLKSRVTISVDTSKNQF SLKLRVSAADTAGYYCASL YNGNGYFDLWGRGTLVTVSS
VH 478 CDR-H1	Residuos 31-37 del SEQ ID NO: 30	SGGHYWS
VH 478 CDR-H2	Residuos 52-67 del SEQ ID NO: 30	YIYSGSTHYNPSLKS
VH 478 CDR-H3	Residuos 99-109 del SEQ ID NO: 30	SLYNGNGYFDL
VL 478	SEQ ID NO: 31	<u>EIVLTQSPGTL</u> LSCRASQSISSGYLAWYQQK PGQAPRLIIYGVSRRTATGIP DRFSGSGSGADFTLTISR LD PEDFVVYYCQYGFSP FT FG GGTKVEIKR

ES 2 385 484 T3

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia 12345678901234567890
Región de la proteína		
VL 478 CDR-L1	Residuos 24-35 del SEQ ID NO: 31	RASQSISSGYLA
VL 478 CDR-L2	Residuos 51-57 del SEQ ID NO: 31	GVSRRAT
VL 478 CDR-L3	Residuos 90-98 del SEQ ID NO: 31	QQYGFSPLT
VH521	SEQ ID NO: 32	QLQLQESGPGLVKPSSETLSL TCTVSGGSIIRSVDYWGWR QPPGKGLEWIGSIYYRGSTY YNPSLKSRTVTSVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARE YSTTWSIDYWGQGLVTVSS
VH 521 CDR-H1	Residuos 31-37 del SEQ ID NO: 32	RSYDYWG
VH 521 CDR-H2	Residuos 52-67 del SEQ ID NO: 32	SIYYRGSTYYNPSLKS
VH 521 CDR-H3	Residuos 100-109 del SEQ ID NO: 32	EYSTTWSIDY
VL 521	SEQ ID NO: 33	ENVLTQSPGTLSSLSPGERAT LSCRASQSIRNNYLAWYQOK PGQAPRLLIHGASSRATGIP DRFGGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYFCQQYGNISITFG PGTKVDVNR
VL 521 CUR-L1	Residuos 24-35 del SEQ ID NO: 33	RASQSIRNNYLA
VL 521 CDR-L2	Residuos 51-57 del SEQ ID NO: 33	GASSRAT
VL 521 CDR L3	Residuos 90-98 del SEQ ID NO: 33	QQYGNISIT
VH 550	SEQ ID NO: 34	QVQLQESGPGLVKPSQTLSSL TCTVSGGSIINSGGYYSWIR QHPGKGLEWIGHISYRGTTY SNPSLKSRTVTSVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARD RGGGFFDLWGRGTLVTVSS
VH 550 CDR-H1	Residuos 31-37 del SEQ ID NO: 34	SGGYYWS
VH 550 CDR-H2	Residuos 52-67 del SEQ ID NO: 34	HISYRGTTYSNPSLKS
VH 550 CDR-H3	Residuos 100-108 del SEQ ID NO: 34	DRGGGFFDL

ES 2 385 484 T3

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia
Región de la proteína		12345678901234567890
VL 550	SEQ ID NO: 35	EIVLTQSPGTL ^S LSLSPGERAT LSCRASQSVNSGYLAWYQOK PGQAPRLLIYGV SIRATDIP DRFSGSGSATDFTLTISRLE PEDFAVYYCQYGFSP ^L TFG GGTRVEINR
VL 550 CDR-L1	Residuos 24-35 del SEQ ID NO: 35	RASQSVNSGYLA
VL 550 CDR-L2	Residuos 51-57 del SEQ ID NO: 35	GVSIRAT
VL 550 CDR-L3	Residuos 90-98 del SEQ ID NO: 35	QQYGFSP ^L T
VH 581	SEQ ID NO: 36	<u>QVQLV</u> ESGGGVQGRSLRL SCAASGFTFSHCGMHWVRQA PGKLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKDH GGSGSPPFY ^Y YGM ^D VWGQG TTVTVSS
VH 581 CDR-H1	Residuos 31-35 del SEQ ID NO: 36	HCGMH
VH 581 CDR-H2	Residuos 50-66 del SEQ ID NO: 36	VISYDGSNKYYADSVKG
VH 581 CDR-H3	Residuos 99-116 del SEQ ID NO: 36	DHGGSGSPPFY ^Y YGM ^D V
VL 581	SEQ ID NO: 37	DILMTQTPLSLSVTPGQPAS ISCKSSQSL ^L HGDGKTYLYW YLQKPGQPPQFLIQELSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRXEAEDVGVYYCMQSLQLP LTFGGGTKVQIKR
VL 581 CDR-L1	Residuos 24-39 del SEQ ID NO: 37	KSSQSL ^L HGDGKTYLY
VL 581 CDR-L2	Residuos 55-61 del SEQ ID NO: 37	ELSNRFS
VL 581 CDR-L3	Residuos 94-102 del SEQ ID NO: 37	MQSLQLP ^L T
Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia
Región de la proteína		12345678901234567890
VH 7.5	SEQ ID NO: 38	<u>QVQLV</u> ESGGGVQGRSLRL SCAASGFTFSY ^Y GMHWVRQA PGKLEWVAVIWYDGRNKYY ADSVKGRVTISRDN SKK ^T LY LQMNSLRAEDTAVYYCAREG GY ^Y YGM ^D VWGQGT ^T TVT ^S S

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia 12345678901234567890
Región de la proteína		
VH 7.5 CDR-H1	Residuos 31-35 del SEQ ID NO: 38	YYGMH
VH 7.5 CDR-H2	Residuos 50-66 del SEQ ID NO: 38	VIWYDGRNKYYADSVKG
VH 7.5 CDR-H3	Residuos 99-108 del SEQ ID NO: 38	EGGYYYGMDV
VL 7.5	SEQ ID NO: 39	EILLTQSPGTLSSLSPGERAT LSCRASQNVSSSYLAWYQQN PGQAPRLLIYGASSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFEVYYCQQSGSSLFTFG PGTKVDIKR
VL 7.5 CDR-L1	Residuos 24-35 del SEQ ID NO: 39	RASQNVSSSYLA
VL 7.5 CDR-L2	Residuos 51-57 del SEQ ID NO: 39	GASSRAT
VL 7.5 CDR-L3	Residuos 90-98 del SEQ ID NO: 39	QQSGSSLFT
VH 2.11	SEQ ID NO: 40	QVQLQESGPGLVKPSQTLS TCTVSGGSIRSGDHYWTWIR QHPGKGLEWIGHIYYSGSTY YNPSLKSRLTISIDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARD YGGNGYFDYWGQGLVTVSS
VH 2.11 CDR-H1	Residuos 31-37 del SEQ ID NO: 40	SGDHYWT
VH 2.11 CDR-H2	Residuos 52-67 del SEQ ID NO: 40	HIYYSGSTYYNPSLKS
VH 2.11 CDR-H3	Residuos 97-109 del SEQ ID NO: 40	CARDYGGNGYFDY
VL 2.11	SEQ ID NO: 41	DIVMTQTPLSLPVTPGPAPAS ISCRSSQSLLDSDDGNTYLD WYLQKPGQSPQLLIYTLSYR ASGVPDRFSGSGSGTDFTLN ISRVEAEDVGVYYCMQRIEF PITFGQGRLEIKR
VL 2.11 CDR-L1	Residuos 24-40 del SEQ ID NO: 41	RSSQSLLDSDDGNTYLD
VL 2.11 CDR-L2	Residuos 56-62 del SEQ ID NO: 41	TLSYRAS
VL 2.11 CDR-L3	Residuos 95-103 del SEQ ID NO: 41	MQRIEFPIT

Las anteriores secuencias de CDR del anticuerpo anti-IL-18 aislado establecen una familia novedosa de proteínas de unión a IL-18, aisladas de acuerdo con esta descripción, y que comprende polipéptidos que incluyen las secuencias de CDR enumeradas en la Tabla 2 de más abajo. Para generar y para seleccionar las CDR de la

invención que tienen la actividad de unión y/o neutralización de IL-18 preferida, se pueden utilizar métodos convencionales conocidos en la técnica para la generación de proteínas de unión de la presente invención y la evaluación de las características de unión y/o neutralización de IL-18 de esas proteínas de unión, incluyendo pero no limitadas a las descritas específicamente en la presente memoria.

5

Tabla 2: Ligandos de afinidad a CDR de IL-18 consenso (los residuos alternativos se enumeran abajo de cada posición de aminoácido: - indica un residuo que puede estar ausente).

región CDR	Identificador de Secuencia	Secuencia Consenso
CDR-H1	SEQ ID NO: 42	<pre> X₁ X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ X₇ S Y W I G - - N G G H Y W T H R Y W S S R S D Y N G Y C S M H V L I D </pre>
CDR-H2	SEQ ID NO: 43	<pre> X₁ X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ X₁₂ X₁₃ X₁₄ X₁₅ X₁₆ X₁₇ F I Y P G D S E T R Y S P T F Q - Y F S Y S G T T Y Y N P S L K S G H W S R G I N S S A D S V K S D R N I V V K H </pre>
CDR-H3	SEQ ID NO: 44	<pre> X₁ X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ X₁₂ X₁₃ X₁₄ X₁₅ X₁₆ X₁₇ X₁₈ V G S G W Y P Y T - - - - - - - D R G S S G S F W F D I Y Y G M D V E D Y Y A S F D D D Y D S S R N G F Y P L Y F Y C K T Y W V M Y H L L D T N G I E V Y W N P Y A V F G </pre>
CDR-L1	SEQ ID NO: 45	<pre> X₁ X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ X₁₂ X₁₃ X₁₄ X₁₅ X₁₆ X₁₇ R A S E S I S S N L A - - - - - K G R I V G G Y L A K N Y L A S Q T L L Y S N N T Y L C D H N F N R R D V E N T Y R N S G K H D G D </pre>
CDR-L2	SEQ ID NO: 46	<pre> X₁ X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ X₇ T A S T R A T G V F I L Q S S T N E W I S F E L R Y </pre>

región CDR	Identificador de Secuencia	Secuencia Consenso
CDR-L3	SEQ ID NO: 47	<pre> X₁ X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₀ Q Q Y N N W P S - - M H N H G S L L I T Y G Y I T T P T S D Y L D C S R G S I I W . V Q F I L F F I E </pre>

D. Usos de los Anticuerpos Anti-IL-18

5 Dada su capacidad para unirse a IL-18 humana, los anticuerpos anti-IL-18 humana, o porciones de los mismos, de la invención se pueden utilizar para detectar IL-18 humana (p. ej., en una muestra biológica, tal como suero o plasma), utilizando un inmunoanálisis convencional, tal como un análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA), un radioinmunoanálisis (RIA) o inmunohistoquímica de tejido. La invención proporciona un método para la detección de IL-18 humana en una muestra biológica que comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención y detectar o el anticuerpo (o porción de anticuerpo) unido a IL-18 humana o anticuerpo (o porción de anticuerpo) no unido, para detectar de ese modo IL-18 humana en la muestra biológica. El anticuerpo se marca directamente o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Las sustancias detectables adecuadas incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminescentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los ejemplos de los complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilaminofluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminescente incluye luminol; y los ejemplos de la material radiactivo adecuado incluyen H³, C¹⁴, S³⁵, Y⁹⁰, Tc⁹⁹, In¹¹¹, I¹²⁵, I¹³¹, Lu¹⁷⁷, HO¹⁶⁶, o Sm¹⁵³.

20 De manera alternativa al marcaje del anticuerpo, la IL-18 humana se puede analizar en fluidos biológicos por medio de inmunoanálisis competitivo utilizando patrones de rhIL-18 marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-IL-18 humana no marcado. En este análisis, la muestra biológica, los patrones de rhIL-18 marcados y el anticuerpo anti-IL-18 humana se combinan y se determina la cantidad de patrón de rhIL-18 marcado unido al anticuerpo no marcado. La cantidad de IL-18 humana en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón de rhIL-18 marcada unido al anticuerpo anti-IL-18.

30 Los anticuerpos y las porciones de anticuerpos de la invención preferiblemente son capaces de neutralizar la actividad humana de IL-18 in vitro e in vivo. Por lo tanto, tales anticuerpos y las porciones de anticuerpos de la invención se pueden utilizar para inhibir actividad de hIL-18, p. ej., en un cultivo celular que contiene hIL-18, en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que tienen IL-18 con la que reacciona de manera cruzada un anticuerpo de la invención. En una realización, la invención proporciona un método para la inhibición de actividad de IL-18 que comprende poner en contacto IL-18 con un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención de manera que se inhiba la actividad de IL-18. Preferiblemente, la IL-18 es IL-18 humana. Por ejemplo, en un cultivo celular que contiene, o se sospecha que contiene hIL-18, se puede añadir un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención al medio de cultivo para inhibir la actividad de hIL-18 en el cultivo.

40 En otra realización, la invención proporciona un método para reducir la actividad de IL-18 en un sujeto, ventajosamente en un sujeto que padecen una enfermedad o trastorno en los que es perjudicial la actividad de Gel-18. La invención proporciona métodos para reducir la actividad de IL-18 en un sujeto que padecen tal enfermedad o trastorno, cuyo método comprende la administración al sujeto de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención de manera que se reduzca la actividad de IL-18 en el sujeto. Preferiblemente, la IL-18 es IL-18 humana y el sujeto es un sujeto humano. Alternativamente, el sujeto puede ser un mamífero que exprese una IL-18 a la que es capaz de unirse un anticuerpo de la invención. Adicionalmente el sujeto puede ser un mamífero en el que se ha introducido hIL-18 (p. ej., por medio de la administración de hIL-18 o por medio de la expresión de un transgen de hIL-18). Un anticuerpo de la invención se puede administrar a un sujeto humano con fines terapéuticos. Por otra parte, un anticuerpo de la invención se puede administrar a un mamífero no humano que exprese IL-18 con el que el anticuerpo es capaz de unirse con fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Considerando lo último, tales modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (p. ej., evaluación de las dosificaciones y evolución temporal de la administración).

Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "un trastorno en el que la actividad de IL-18 es perjudicial" incluya una enfermedad y otros trastornos en los que se ha demostrado que la presencia de IL-18 en un sujeto que padece el trastorno es o se sospecha que es o responsable de la patofisiología del trastorno o un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno. Por lo tanto, un trastorno en el que actividad de IL-18 es perjudicial es un trastorno en el que se espera que la reducción de actividad de IL-18 alivie los síntomas y/o el progreso del trastorno. Tales trastornos se pueden poner de manifiesto, por ejemplo, mediante un aumento en la concentración de IL-18 en un fluido biológico de un sujeto que padezca el trastorno (*p. ej.*, un aumento en la concentración de IL-18 en suero, plasma, líquido sinovial, *etc.* del sujeto), que se puede detectar, por ejemplo, utilizando un anticuerpo anti-IL-18 como se ha descrito anteriormente. Los ejemplos no limitantes de los trastornos que se pueden tratar con los anticuerpos de la invención incluyen los trastornos comentados en la sección de más abajo concernientes a las composiciones farmacéuticas de los anticuerpos de la invención.

D. Composición Farmacéutica

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica comprende adicionalmente al menos un agente terapéutico adicional para el tratamiento de un trastorno en el que actividad de IL-18 es perjudicial.

Los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención se pueden incorporar a las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto. Por lo general, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Según se utiliza en la presente memoria, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden comprender adicionalmente cantidades mínimas de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes y emulsionantes, conservantes o tampones, que aumentan la vida útil o la eficacia del anticuerpo o de la porción de anticuerpo.

Los anticuerpos y porciones anticuerpo de la invención se pueden incorporar a una composición farmacéutica adecuada para su administración parenteral. Preferiblemente, el anticuerpo o las porciones de anticuerpo se prepararán en forma de una solución inyectable que contiene 0,1-250 mg/ml de anticuerpo. La solución inyectable puede estar compuesta o de una forma de dosificación líquida o liofilizada en un vial, ampolla o jeringa precargada de vidrio blanco o ámbar. El tampón puede ser de L-histidina (1-50 mM), óptimamente 5-10 mM, a pH de 5,0 a 7,0 (óptimamente pH 6,0). Otros tampones adecuados incluyen pero no están limitados a, succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio. Se puede utilizar cloruro de sodio para modificar la toxicidad de la solución a una concentración de 0-300 mM (óptimamente 150 mM para una forma de dosificación líquida). Se pueden incluir crioprotectores para una forma de dosificación liofilizada, principalmente sacarosa al 0-10% (óptimamente al 0,5-1,0%). Otros crioprotectores adecuados incluyen trehalosa y lactosa. Se pueden incluir agentes volumétricos para una forma de dosificación liofilizada, principalmente manitol al 1-10% (óptimamente 2-4%). Se pueden utilizar estabilizadores en formas de dosificación tanto líquidas como liofilizadas, principalmente L-Metionina 1-50 mM (óptimamente 5-10 mM). Otros agentes volumétricos adecuados incluyen glicina, arginina, pueden estar incluidos en forma de polisorbato-80 al 0-0,05% (óptimamente al 0,005-0,01%). Los tensioactivos adicionales incluyen pero no están limitados a polisorbato 20 y tensioactivos BRU.

Las composiciones de esta invención pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semi-sólidas y sólidas; tales como soluciones líquidas (*p. ej.*, soluciones inyectables e infundibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo de administración y la aplicación terapéutica deseados. Las composiciones preferidas típicas están en forma de soluciones inyectables o infundibles, tales como composiciones similares a las usadas para la inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos. El modo de administración preferido es parenteral (*p. ej.*, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una realización preferida, el anticuerpo se administra por medio de infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferida, el anticuerpo se administra mediante una inyección intramuscular o subcutánea.

Las composiciones terapéuticas por lo general deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular en forma de una solución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo (*es decir*, anticuerpo o porción de anticuerpo) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización mediante filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando

el compuesto activo en un vehículo estéril que contenga un medio de dispersión alcalino y los otros ingredientes requerido de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos liofilizados, estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secados a vacío y secado de rocío que rinde un polvo del ingrediente activo más un ingrediente deseado adicional a partir de su solución esterilizada previamente mediante filtración. La fluidez apropiada de una solución se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un agente de revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables se puede facilitar incluyendo, en la composición, un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales monoestearato y gelatina.

Los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la presente invención se pueden administrar por medio de una variedad de métodos conocidos en la técnica, si bien para muchas aplicaciones terapéuticas, la ruta/modo de administración preferidos son la inyección subcutánea, la inyección o infusión intravenosa. Como apreciarán los expertos en la técnica, la ruta y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. En ciertas realizaciones, el compuesto activo se puede preparar con un portador que protegerá el compuesto de la rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de liberación microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biocompatibles, biodegradables, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres, y poli(ácido láctico). Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son conocidos generalmente por los expertos en la técnica. Véase, *p. ej.*, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención se puede administrar oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) se puede englobar también en una cápsula de gelatina con cubierta exterior de gelatina dura o blanda, comprimir en comprimidos, o incorporar directamente a la dieta del sujeto. Para su administración terapéutica oral, a los compuestos se les pueden incorporar excipientes y utilizar en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas; elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Para administrar un compuesto de la invención por medio de otra administración diferente de la parenteral, puede ser necesario revestir el compuesto con, o administrar simultáneamente el compuesto con, un material que evite su inactivación.

También se pueden incorporar a las composiciones compuestos activos suplementarios. En ciertas realizaciones, se formula simultáneamente y/o administra simultáneamente un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para el tratamiento de trastornos en los que es perjudicial la actividad de IL-18. Por ejemplo, anticuerpo o porción de anticuerpo anti-hIL-18 de la invención se puede formular simultáneamente y/o administrar simultáneamente con uno o más anticuerpos adicionales que se unen a otras dianas (*p. ej.*, anticuerpos que se unen a otras citoquinas o que se unen a moléculas de la superficie celular). Además, se pueden utilizar uno o más anticuerpos de la invención combinados con dos o más de los agentes terapéuticos anteriores. Tales terapias combinadas pueden utilizar ventajosamente dosificaciones menores de los agentes terapéuticos administrados, evitando de este modo toxicidades o complicaciones posibles asociadas con las diversas monoterapias.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo contra IL-18 o fragmento del mismo se asocia a un vehículo de vida media prolongada conocido en la técnica. Tales vehículos incluyen, pero no están limitados a, el dominio Fc, polietilenglicol, y dextrano. Tales vehículos se describen, *p. ej.*, en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos con el Núm. de Serie 09/428.082 y la Solicitud PCT Publicada Núm. WO 99/25044.

La interleuquina 18 juega un papel crítico en la patología asociada con una variedad de enfermedades que implican elementos inflamatorios e inmunitarios. Estas enfermedades incluyen, pero no están limitadas a, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis crónica juvenil, artritis séptica, artritis de Lyme, artritis psoriásica, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus eritematoso generalizado, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes mellitus insulino dependiente, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, dermatitis, esclerodermia, enfermedad de injerto contra anfitrión, rechazo en el trasplante de órganos, enfermedad inmunitaria aguda o crónica asociada con el trasplante de órganos, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Graves, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schoenlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis activa crónica, uveítis, choque séptico, síndrome de choque tóxico, síndrome de sepsis, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasitarias, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversa aguda, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, ictus, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, neoplasias, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, enfermedad de Addison, deficiencia poliglandular de tipo I y deficiencia poliglandular de tipo II, esporádicas, síndrome de Schmidt, síndrome de dificultad respiratoria (aguda) del adulto, alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía psoriásica, artropatía colítica ulcerosa, sinovitis enteropática, clamidia, artropatía asociada a yersinia y salmonella, espondiloartropatía, enfermedad ateromatosa/arteriosclerosis, alergia atópica, enfermedad bulosa autoinmune,

pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, penfigoide, enfermedad de IgA lineal, anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica positiva de Coombs, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis miálgica/Enfermedad de Royal Free, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de células gigantes, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmune criptogénica, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, Enfermedades Relacionadas con la Inmunodeficiencia Adquirida, Hepatitis B, Hepatitis C, inmunodeficiencia variada común (hipogammaglobulinemia variable común), cardiopatía dilatada, infertilidad femenina, insuficiencia ovárica, insuficiencia ovárica prematura, enfermedad pulmonar fibrótica, alveolitis fibrosante criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial post-inflamatoria, neumonitis intersticial, enfermedad pulmonar intersticial asociada a enfermedad del tejido conectivo, enfermedad pulmonar asociada a enfermedad del tejido conectivo mixta, esclerosis sistémica asociada a enfermedad pulmonar intersticial, artritis reumatoide asociada a enfermedad pulmonar intersticial, lupus eritematoso generalizado asociado a enfermedad pulmonar, dermatomiositis/polimiositis asociadas a enfermedad pulmonar, enfermedad de Sjögren asociada a enfermedad pulmonar, espondilitis anquilosante asociada a enfermedad pulmonar, enfermedad pulmonar difusa vasculítica, hemosiderosis asociada a enfermedad pulmonar, enfermedad pulmonar intersticial inducida por fármacos, fibrosis, fibrosis por radiación, bronquiolitis obliterans, neumonía eosinofílica crónica, enfermedad pulmonar infiltrante linfocítica, enfermedad pulmonar intersticial postinfecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmune, hepatitis autoinmune de tipo 1 (hepatitis autoinmune clásica o lupoide), hepatitis autoinmune de tipo 2 (hepatitis anti-anticuerpo LKM), hipoglicemia mediada por procesos autoinmunes, resistencia a insulina de tipo B con acantosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad inmunitaria aguda asociada con el trasplante de órganos, enfermedad inmunitaria crónica asociada con el trasplante de órganos, osteoartritis, colangitis esclerosante primaria, psoriasis de tipo 1, psoriasis de tipo 2, leucopenia idiopática, neutropenia autoinmune, enfermedad renal NOS, glomerulonefritis, vasculitis microscópica de los riñones, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso discoide, infertilidad masculina idiopática o NOS, autoinmunidad espermática, esclerosis múltiple (todos los subtipos), oftalmia simpática, hipertensión pulmonar asociada a enfermedad del tejido conectivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nodosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumatoide, enfermedad de Still, esclerosis generalizada, síndrome de Sjögren, enfermedad de Takayasu/arteritis, trombocitopenia autoinmune, trombocitopenia idiopática, enfermedad tiroidea autoinmune, hipertiroidismo, hipotiroidismo autoinmune goitrosa (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmune atrófico, mixoedema primario, uveítis facogénica, vasculitis primaria, vitiligo, enfermedad hepática aguda, enfermedades hepáticas crónicas, cirrosis alcohólica, lesión hepática inducida por alcohol, coleostasis, enfermedad hepática idiosincrática, hepatitis inducida por fármacos, esteatohepatitis no alcohólica, alergia y asma, infección por estreptococos del grupo B (GBS), trastornos mentales (*p. ej.*, depresión y esquizofrenia), enfermedades mediadas por Tipo Th2 y Tipo Th1, dolor agudo y crónico (diferentes formas de dolor), y cánceres tales como pulmón, mama, estómago, vejiga, colon, páncreas, ovario, próstata y cáncer de recto y neoplasias hematopoyéticas (leucemia y linfoma). Los anticuerpos humanos, y las porciones de anticuerpos de la invención se pueden utilizar para tratar seres humanos que padecen enfermedades autoinmunitarias, en particular aquellas asociadas con inflamación, incluyendo, espondilitis reumatoide, alergia, diabetes autoinmune, uveítis autoinmune.

Preferiblemente, los anticuerpos de la invención o sus porciones de unión al antígeno, se utilizan para tratar la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la esclerosis múltiple, la diabetes mellitus insulino dependiente y la psoriasis.

Un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención también se puede administrar con uno o más agente terapéuticos adicionales útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias.

Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión al antígeno de los mismos se pueden utilizar solos o combinados para tratar tales enfermedades. Se debe entender que los anticuerpos de la invención o la porción de unión al antígeno de los mismos se pueden utilizar solos o combinados con un agente adicional, *p. ej.*, un agente terapéutico, seleccionándose dicho agente adicional por el experto en la técnica para su propósito deseado. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en la técnica por ser útil para tratar la enfermedad o afección que esté siendo tratada por el anticuerpo de la presente invención. El agente adicional también puede ser un agente que confiera un atributo beneficioso a la composición terapéutica *p. ej.*, un agente que tenga efecto sobre la viscosidad de la composición.

Se debe entender además que las combinaciones que se van a incluir en esta invención son aquellas combinaciones útiles para el propósito deseado. Los agentes ilustrados más abajo son ilustrativos de los fines y no se pretende que estén limitados. Las combinaciones, que son parte de esta invención, pueden ser los anticuerpos de la presente invención y al menos un agente adicional seleccionado de las listas de más abajo. Las combinación puede incluir también más de un agente adicional, *p. ej.*, dos o tres agentes adicionales si la combinación es de manera que la composición formada puede realizar su función deseada.

Las combinaciones preferidas con uno o varios fármacos antiinflamatorios no esteroideos también referidos como AINES que incluyen fármacos de tipo ibuprofeno. Otras combinaciones preferidas son corticoesteroides que incluyen prednisolona; los efectos secundarios bien conocidos del uso de esteroides se pueden reducir o incluso eliminar disminuyendo la dosis requerida de esteroide cuando se tratan pacientes en combinación con los anticuerpos anti-IL-18 de esta invención. Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para la artritis reumatoide con los

que se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: uno o varios fármacos antiinflamatorios supresores de citoquinas (FASC); anticuerpos o antagonistas de otra citoquinas humanas o factores de crecimiento, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-16, IL-21, IL-23, interferones, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión al antígeno de los mismos, se pueden combinar con anticuerpos para moléculas de la superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, CTLA o sus ligandos incluyendo CD154 (gp39 o CD40L).

Las combinaciones preferidas de los agentes terapéuticos puede interferir en diferentes puntos en la cascada autoinmune e inflamatoria subsiguiente; los ejemplos preferidos incluyen antagonistas de TNF como anticuerpos contra TNF quimérico, humanizado o humano, D2E7, (Publicación PCT Núm. WO 97/29131), CA2 (Remicade™), CDP 571, y receptores de TNF p55 o p75 solubles, derivados de los mismos, (p75TNFR1gG (Enbrel™) o p55TNFR1gG (Lenercept), y también inhibidores de la enzima convertora de TNFα (TACE); de un modo similar los inhibidores de IL-1 (inhibidores de la enzima convertora de Interleuquina-1, IL-1RA etc.) pueden ser eficaces por la misma razón. Otras combinaciones preferidas incluyen interleuquina 11. Otra combinación preferida adicional son otros actores clave de la respuesta autoinmune que pueden actuar en paralelo a, dependiente de o en concierto con la función de IL-18; son especialmente preferidos los antagonistas de IL-12 incluyendo anticuerpos IL-12 o receptores solubles de IL-12, o proteínas de unión IL-12. Se ha demostrado que IL-12 y IL-18 tienen funciones solapantes pero distintas y puede ser muy eficaz una combinación de antagonistas para ambas. Otras combinaciones preferidas adicionales son los inhibidores anti-CD4 no dañinos. Otras combinaciones preferidas adicionales incluyen antagonistas de la ruta co-estimuladora de CD80 (B7.1) o CD86 (B7.2) incluyendo anticuerpos, receptores solubles o ligandos antagonísticos.

Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión al antígeno de los mismos, se pueden combinar también con agentes, tales como metotrexato, 6-MP, azatioprina, sulfasalazina, mesalazina, olsalazina, cloroquinina/hidroxicloroquina, pencilamina, aurotionalato (intramuscular y oral), azatioprina, colchicina, corticoesteroides (oral, inhalado y inyección local), agonistas del adrenoreceptor beta-2 (salbutamol, terbutalina, salmeterol), xantinas (teofilina, aminofilina), cromoglicato, nedocromil, cetotifeno, ipratropio y oxitropio, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenonato de mofetilo, leflunomida, AINES, por ejemplo, ibuprofeno, corticoesteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con señalización mediante citoquinas proinflamatorias tales como TNFα o IL-1 (p. ej. AK, NIK, IKK, p38 o inhibidores de quinasa MAP), inhibidores de la enzima convertora de IL-1β, inhibidores de la enzima convertora de TNFα (TACE), inhibidores de la señalización de células T tales como inhibidores de quinasas, inhibidores de metaloproteinasas, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptoporinas, inhibidores de la enzima convertora de angiotensina, receptores de citoquina solubles y derivados de los mismos (p. ej. receptores de TNF p55 o p75 solubles y los derivados p75TNFR1gG (Enbrel™ y p55TNFR1gG (Lenercept)), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), citoquinas antiinflamatorias (p. ej. IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGFβ), celecoxib, ácido fólico, sulfato de hidroxycloroquina, rofecoxib, etanercept, infliximab, naproxeno, valdecoxib, sulfasalazina, metilprednisolona, meloxicam, acetato de metilprednisolona, tiomalato sódico de oro, aspirina, acetónido de triamcinolona, napsilato de propoxifeno/apap, folato, nabumetona, diclofenaco, piroxicam, etodolac, diclofenaco sódico, oxaprozina, hcl de oxicodona, bitartrato de hidrocodona/apap, diclofenaco sódico/misoprostol, fentanilo, anakinra, recombinante humano, hcl de tramadol, salsalato, sulindac, cianocobalamina/fa/piridoxina, acetaminofeno, alendronato sódico, prednisolona, sulfato de morfina, hidrocloreuro de lidocaína, indometacina, glucosamina, sulfato de condroitina, hcl de amitriptilina, sulfadiazina, hcl de oxicodona/acetaminofeno, hcl de olopatadina, misoprostol, naproxeno sódico, omeprazol, ciclofosfamida, rituximab, IL-1 TRAP, MRA, CTLA4-IG, IL-18 BP, anti-IL-12, Anti-IL15, BIRB-796, SCIO-469, VX-702, AMG-548, VX-740, Roflumilast, IC-485, CDC-801, y Mesopram. Las combinaciones preferidas incluyen metotrexato o leflunomida y en caso de artritis reumatoide moderados o severos, ciclosporina.

Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para enfermedad inflamatoria intestinal con los que se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: budesonida; factor de crecimiento epidérmico; corticoesteroides; ciclosporina, sulfasalazina; aminosalicilatos; 6-mercaptoporina; azatioprina; metronidazol; inhibidores de lipoxigenasa; mesalamina; olsalazina; balsalazida; antioxidantes; inhibidores de tromboxano; antagonistas del receptor de IL-1; anticuerpos monoclonales anti-IL-1β; anticuerpos monoclonales anti-IL-6; factores de crecimiento; inhibidores de elastasa; compuestos de piridinil-imidazol; anticuerpos contra o antagonistas de otras citoquinas humanas o factores de crecimiento, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-16, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión al antígeno de los mismos, se pueden combinar con anticuerpos contra moléculas de la superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión al antígeno de los mismos, también se pueden combinar con agentes, tales como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenonato de mofetilo, leflunomida, AINES, por ejemplo, ibuprofeno, corticoesteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización mediante citoquinas proinflamatorias tales como TNFα o IL-1 (p. ej. IRAK, NIK, IKK, p38 o inhibidores

de quinasa MAP), inhibidores de la enzima convertora de IL-1 β , inhibidores de la enzima convertora de TNF α , inhibidores de la señalización de células T tales como inhibidores de quinasas, inhibidores de metaloproteinasas, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertora de angiotensina, receptores de citoquinas solubles y derivados de los mismos (p. ej. receptores de TNF p55 o p75 solubles, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) y citoquinas antiinflamatorias (p. ej. IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGF β).

Los ejemplos preferidos de los agentes terapéuticos para la enfermedad de Crohn en los que se puede combinar un anticuerpo o una porción de unión al antígeno incluyen los siguientes: antagonistas de TNF, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF, D2E7 (Publicación PCT Núm. WO 97/29131; HUMIRA), CA2 (RENUCADE), CDP 571, constructos de TNFR-Ig, (p75TNFR1gG (ENBREL) e inhibidores de p55TNFR1gG (LENERCEPT)) e inhibidores de PDE4. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión al antígeno de los mismos, se pueden combinar con corticoesteroides, por ejemplo, budenosida y dexametasona. Los anticuerpos de la invención o porciones de unión al antígeno de los mismos, también se pueden combinar con agentes tales como sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico y olsalazina, y agentes que interfieren con la síntesis o la acción de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1, por ejemplo, inhibidores de la enzima convertora de IL-1 β e IL-1ra. Los anticuerpos de la invención o la porción de unión al antígeno de los mismos se pueden utilizar también con inhibidores de la señalización de células T, por ejemplo, 6-mercaptopurinas inhibidoras de tirosina quinasas. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión al antígeno de los mismos, se pueden combinar con IL-11. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión al antígeno de los mismos, se pueden combinar con mesalamina, prednisona, azatioprina, mercaptopurina, infliximab, metilprednisolona, succinato de sodio, difenoxilato/sulfato de atropina, hidrocloreuro de loperamida, metotrexato, omeprazol, folato, ciprofloxacina/dextrosa-agua, bitartrato de hidrocodona/apap, hidrocloreuro de tetraciclina, fluocinonida, metronidazol, timerosal/ácido bórico, colestiramina/sacarosa, hidrocloreuro de ciprofloxacina, sulfato de hiosciamina, hidrocloreuro de meperidina, hidrocloreuro de midazolam, hcl de oxycodona/acetaminofeno, hidrocloreuro de prometazina, fosfato de sodio, sulfametoxazol/trimetoprim, celecoxib, policarbófilo, propoxifeno napsilato, hidrocortisona, multivitaminas, balsalazida disódica, fosfato de codeína/apap, hcl de colesevelam, cianocobalamina, ácido fólico, levofloxacina, metilprednisolona, natalizumab e interferón-gamma.

Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para la esclerosis múltiple con los que se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: corticoesteroides; prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida; ciclosporina; metotrexato; 4-aminopiridina; tizanidina; interferón- β 1a (AVONEX; Biogen); interferón- β 1b (BETASERON; Chiron/Berlex); interferón α -n3 (Interferón Sciences/Fujimoto), interferón- α (Alfa Wassermann/J&J), interferón β 1A-IF (Serono/Inhale Therapeutics), Peginterferón α 2b (Enzon/Schering-Plough), Copolímero 1 (Cop-1; COPAXONE; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); oxígeno hiperbárico; inmunoglobulina intravenosa; clabribina; anticuerpos contra o antagonistas de otras citoquinas humanas o factores de crecimiento y sus receptores, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-23, IL-15, IL-16, EMAP-II GM-CSF, FGF, y PDGF. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión al antígeno de los mismos, se pueden combinar con anticuerpos contra moléculas de la superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CDB, CD19, CD20, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 o sus ligandos. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión al antígeno de los mismos, también se pueden combinar con agentes, tales como metotrexato, ciclosporina; FK506, rapamicina, micofenonato de mofetilo, leflunomida, AINES, por ejemplo, ibuprofeno, corticoesteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con señalización mediante citoquinas proinflamatorias tales como TNF α o IL-1 (p. ej. IRAK, NIK, IKK, p38 o inhibidores de quinasa MAP), inhibidores de la enzima convertora de IL-1 β , inhibidores de TACE, inhibidores de la señalización de células T tales como inhibidores de quinasas, inhibidores de metaloproteinasas, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertora de angiotensina, receptores de citoquinas solubles y derivados de los mismos (p. ej. receptores de TNF p55 o p75 solubles, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) y citoquinas antiinflamatorias (p. ej. IL-4, IL-10, IL-13 y TNF β).

Los ejemplos preferidos de los agentes terapéuticos para la esclerosis múltiple en los que el anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo se pueden combinar incluyen interferón- β , por ejemplo, IFN β 1a y IFN β 1b; copaxona, corticoesteroides, inhibidores de caspasa, por ejemplo inhibidores de caspasa-1, inhibidores de IL-1, inhibidores de TNF, y anticuerpos contra el ligando de CD40 y CD80.

Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión al antígeno de los mismos, también se pueden combinar con agentes, tales como alemtuzumab, dronabinol, Unimed, daclizumab, mitoxantrona, hidrocloreuro de xaliproden, fampridina, acetato de glatiramer, natalizumab, sinnabidol, inmunoquina-a NNSO3, ABR-215062, Anergix.MS, antagonistas de receptores de quimioquinas, BBR-2778, calagualina, CPI-1189, LEM (mitoxantrona encapsulada en liposomas), THC.CBD (agonista cannabinoide) MBP-8298, mesopram (inhibidor de PDE4), MNA-715, anticuerpo anti-receptor de IL-6, neurovax, pirfenidona allotrap 1258 (RDP-1258), sTNF-R1, talampanel, teriflunomida, TGF-beta2, tiplimotida, antagonistas de SLA-4 (por ejemplo, TR-14035, VLA4 Ultrahaler, Antegran-ELANBiogen), antagonistas de interferón gamma, agonistas de IL-4.

- Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para la Angina con los que se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: aspirina, nitroglicerina, mononitrato de isosorbida, succinato de metoprolol, atenolol, tartrato de metoprolol, besilato de amlodipino, hidrocloreuro de diltiazem, dinitrato de isosorbida, bisulfato de clopidogrel, nifedipina, atorvastatina cálcica, cloruro de potasio, furosemida, simvastatina, hcl de verapamilo, digoxina, hidrocloreuro de propranolol, carvedilol, lisinopril, espironolactona, hidrocloreuro de diltiazem, maleato de enalapril, nadolol, ramipril, enoxaparina sódica, heparina sódica, valsartan, hidrocloreuro de sotalol, fenofibrato, ezetimiba, bumetanida, losartan potásico, lisinopril/hidrocloreuro de diltiazem, felodipina, captopril, fumarato de bisoprolol.
- Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para la Espondilitis Anquilosante con los que se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: ibuprofeno, diclofenaco y misoprostol, naproxeno, meloxicam, indometacina, diclofenaco, celecoxib, rofecoxib, Sulfasalazina, Metotrexato, azatioprina, minociclina, prednisona, etanercept, infliximab.
- Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para el Asma con los que se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: albuterol, salmeterol/fluticasona, montelukast sódico, propionato de fluticasona, budesónida, prednisona, xinafoato de salmeterol, hcl de levalbuterol, albuterol sulfato de ipratropio, fosfato de sodio de prednisolona, acetónido de triamcinolona, dipropionato de beclometasona, bromuro de ipratropio, azitromicina, acetato de pirbuterol, prednisolona, teofilina anhidra, succinato de sodio de metilprednisolona, claritromicina, zafirlucast, fumarato de formoterol, vacuna del virus de la influenza, metilprednisolona, trihidrato de amoxicilina, flunisolida, inyección contra la alergia, cromolina sódica, hidrocloreuro de fexofenadina, flunisolida/mentol, amoxicilina/clavulanato, levofloxacina, dispositivo estimulador del inhalador, guaifenesina, fosfato de sodio de dexametasona, hcl de moxifloxacina, hcl de doxiciclina, guaifenesina/d-metorfano, p-efedrina/cod/clorfenir, gatifloxacina, hidrocloreuro de cetirizina, furoato de mometasona, xinafoato de salmeterol, benzonatato, cefalexina, pe/hidrocodona/clorfenir, hcl de cetirizina/pseudoefedrina, fenilefrina/cod/prometazina, codeína/prometazina, cefprozil, dexametasona, guaifenesina/pseudoefedrina, clorfeniramina/hidrocodona, nedocromil sódico, sulfato de terbutalina, epinefrina, metilprednisolona, sulfato de metaproterenol.
- Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para la EPOC con los que se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: sulfato de albuterol/ipratropio, bromuro de ipratropio, salmeterol/fluticasona, albuterol, xinafoato de salmeterol, propionato de fluticasona, prednisona, teofilina anhidra, succinato de sodio de metilprednisolona, montelukast sódico, budesónida, fumarato de formoterol, acetónido de triamcinolona, levofloxacina, guaifenesina, azitromicina, dipropionato de beclometasona, hcl de levalbuterol, flunisolida, ceftriaxona sódica, trihidrato de amoxicilina, gatifloxacina, zafirlucast, amoxicilina/clavulanato, flunisolida/mentol, clorfeniramina/hidrocodona, sulfato de metaproterenol, metilprednisolona, furoato de mometasona, p-efedrina/cod/clorfenir, acetato de pirbuterol, p-efedrina/loratadina, sulfato de terbutalina, bromuro de tiotropio, (R,R)-formoterol, TgAAT, Cilomilast, Roflumilast.
- Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para el HCV con los que se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: Interferón-alfa-2a, Interferón-alfa-2b, Interferón-alfa con1, Interferón-alfa-n1, interferón-alfa-2a Pegilado, interferón-alfa-2b Pegilado, ribavirina, Peginterferón alfa-2b + ribavirina, Ácido Ursodesoxicólico, Ácido Glicirrónico, Timalfasina, Maxamina, VX-497 y cualquier compuesto que se utilice para tratar el HCV a través de la intervención con las siguientes dianas: polimerasa de HCV, proteasa de HCV, helicasa de HCV, HCV IRES (sitio interno de entrada al ribosoma).
- Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para la Fibrosis Pulmonar idiopática con los que se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: prednisona, azatioprina, albuterol, colchicina, sulfato de albuterol, digoxina, interferón gamma, succinato sódico de metilprednisolona, lorazepam, furosemida, lisinopril, nitroglicerina, espironolactona, ciclofosfamida, bromuro de ipratropio, actinomicina d, alteplasa, propionato de fluticasona, levofloxacina, sulfato de metaproterenol, sulfato de morfina, hcl de oxicodona, cloruro de potasio, acetónido de triamcinolona, tacrólimo anhidro, calcio, interferón-alfa, metotrexato, micofenonato de mofetilo, Interferón-gamma-1 β .
- Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para el Infarto de Miocardio con los que se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: aspirina, nitroglicerina, tartrato de metoprolol, enoxaparina sódica, heparina sódica, bisulfato de clopidogrel, carvedilol, atenolol, sulfato de morfina, succinato de metoprolol, warfarina sódica, lisinopril, mononitrato de isosorbida, digoxina, furosemida, simvastatina, ramipril, tenecteplasa, maleato de enalapril, torsemida, retavasa, losartan potásico, hcl de quinapril/carb mag, bumetanida, alteplasa, enalaprilato, hidrocloreuro de amiodarona, m-hidrato de hcl de tirofiban, hidrocloreuro de diltiazem, captopril, irbesartan, valsartan, hidrocloreuro de propranolol, fosinopril sódico, hidrocloreuro de lidocaína, eptifibatida, cefazolina sódica, sulfato de atropina, ácido aminocaproico, espironolactona, interferón, hidrocloreuro de sotalol, cloruro de potasio, docusato sódico, hcl de dobutamina, alprazolam, pravastatina sódica, atorvastatina

cálcica, hidroclicloruro de midazolam, hidroclicloruro de meperidina, dinitrato de isosorbida, epinefrina, hidroclicloruro de dopamina, bivalirudina, rosuvastatina, ezetimiba/simvastatina, avasimiba, cariporida.

5 Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para la Psoriasis con los que se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: calcipotrieno, propionato de clobetasol, acetónido de triamcinolona, propionato de halobetasol, tazaroteno, metotrexato, fluocinonida, dipropionato aumentado de betametasona, acetónido de fluocinolona, acitretina, champú de alquitrán, valerato de betametasona, furoato de mometasona, cetoconazol, pramoxina/fluocinolona, valerato de hidrocortisona, flurandrenólido, urea, betametasona, propionato de clobetasol/emol, propionato de fluticasona, azitromicina, hidrocortisona, fórmula humectante, ácido fólico, desonida, pimecrólmo, alquitrán de hulla, diacetato de diflorasona, folato de etanercept, ácido láctico, metoxsaleno, hc/bismuto subgal/znox/resor, acetato de metilprednisolona, prednisona, filtro solar, halcinonida, ácido salicílico, antralina, pivalato de clocortolona, extracto de hulla, alquitrán de hulla /ácido salicílico, alquitrán de hulla/ácido salicílico/azufre, desoximetasona, diazepam, emoliente, fluocinonida/emoliente, aceite mineral/aceite de ricino/lactona, aceite mineral/aceite de cacahuete, petróleo/misristato de isopropilo, psoraleno, ácido salicílico, jabón/tribromsalan, timerosal/ácido bórico, celecoxib, infliximab, ciclosporina, alefacept, efalizumab, tacrólimo, pimecrólmo, PUVA, UVB, sulfasalazina.

20 Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para la Artritis Psoriática con los que se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: metotrexato, etanercept, rofecoxib, celecoxib, ácido fólico, sulfasalazina, naproxeno, leflunomida, acetato de metilprednisolona, indometacina, sulfato de hidroxiclороquina, prednisona, sulindac, diprop aumentado de betametasona, infliximab, metotrexato, folato, acetónido de triamcinolona, diclofenaco, dimetilsulfóxido, piroxicam, diclofenaco sódico, cetoprofeno, meloxicam, metilprednisolona, nabumetona, tolmetina sódica, calcipotrieno, ciclosporina, diclofenaco sódico/misoprostol, fluocinonida, sulfato de glucosamina, tiomalato sódico de oro, bitartrato de hidrocodona/apap, ibuprofeno, risedronato sódico, sulfadiazina, tioguanina, valdecoxib, alefacept, efalizumab.

30 Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para la Restenosis con los que se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: sirolimo, paclitaxel, everólmo, tacrólimo, ABT-578, acetaminofeno.

Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para la Ciática con los que se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: bitartrato de hidrocodona/apap, rofecoxib, hcl de ciclobenzaprina, metilprednisolona, naproxeno, ibuprofeno, hcl de oxicodona/acetaminofeno, celecoxib, valdecoxib, acetato de metilprednisolona, prednisona, fosfato de codeína/apap, hcl de tramadol/acetaminofeno, metaxalona, meloxicam, metocarbamol, hidroclicloruro de lidocaína, diclofenaco sódico, gabapentina, dexametasona, carisoprodol, cetorolaco de trometamina, indometacina, acetaminofeno, diazepam, nabumetona, hcl de oxicodona, hcl de tizanidina, diclofenaco sódico/misoprostol, napsilato de propoxifeno/apap, asa/oxicod/ter de oxicodona, ibuprofeno/bit de hidrocodona, hcl de tramadol, etodolac, hcl de propoxifeno, hcl de amitriptilina, carisoprodol/fos de codeína/asa, sulfato de morfina, multivitaminas, naproxeno sódico, citrato de orfenadrina, temazepam.

40 Los ejemplos preferidos de los agentes terapéuticos para el LEG (Lupus) en el que un anticuerpo o una porción de unión al antígeno se pueden combinar incluyen los siguientes: AINES, por ejemplo, diclofenaco, naproxeno, ibuprofeno, piroxicam, indometacina; inhibidores de COX2, por ejemplo, Celecoxib, rofecoxib, valdecoxib; anti-maláricos, por ejemplo, hidroxiclороquina; Esteroides, por ejemplo, prednisona, prednisolona, budenosida, dexametasona; Citotóxicos, por ejemplo, azatioprina, ciclofosfamida, micofenonato de mofetilo, metotrexato; inhibidores de PDE4 o inhibidor de la síntesis de porina, por ejemplo Cellcept. Los anticuerpos de la invención o porciones de unión al antígeno de los mismos, también se pueden combinar con agentes tales como sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico, olsalazina, Imuran y agentes que interfieren con la síntesis, la producción o la acción de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1, por ejemplo, inhibidores de caspasa como inhibidores de la enzima conversora de IL-1 β y IL-1ra. Los anticuerpos de la invención o la porción de unión al antígeno de los mismos se pueden utilizar también con inhibidores de la señalización de células T, por ejemplo, inhibidores de tirosina quinasas; o moléculas que dirigen la activación células T, por ejemplo, CTLA-4-IgG o anticuerpos de la familia anti-B7, anticuerpos de la familia anti-PD-1. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión al antígeno de los mismos, se pueden combinar con IL-11 o anticuerpos anti-citoquinas, por ejemplo, fonotolizumab (anticuerpo anti-IFNg), o anticuerpos anti-receptores, por ejemplo, anticuerpo anti-receptor de IL-6 y anticuerpos contra moléculas de la superficie de células B. Los anticuerpos de la invención o la porción de unión al antígeno de los mismos se pueden utilizar también con LJP 394 (abetimus), agentes que agotan o inactivan las células B, por ejemplo, Rituximab (anticuerpo anti-CD20), linfoestat-B (anticuerpo anti-BlyS), antagonistas de TNF, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF, D2E7 (Publicación PCT Núm. WO 97/29131; HUMIRA), CA2 (REMICADE), CDP 571, constructos de TNFR-Ig, (p75TNFRlgG (ENBREL) y p55TNFRlgG (LENERCEPT)).

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o a "cantidad profilácticamente eficaz" de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" hace referencia a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante los períodos de tiempo

necesarios, para lograr el efecto terapéutico deseado. Un experto en la técnica puede determinar la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o porción de anticuerpo y puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, la edad, el sexo, y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo para lograr una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o porción de anticuerpo es contrarrestado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" hace referencia a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Por lo general, puesto que se utiliza una dosis profiláctica en sujetos antes o en una fase temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta deseada óptima (p. ej., una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un bolo individual, se pueden administrar dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o aumentar la dosis proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en una forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de dosificación. Forma de dosificación unitaria según se utiliza en la presente memoria hace referencia a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se vayan a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. Las especificaciones para las formas de dosificación unitarias de la invención están dictadas o dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico concreto que se vaya a lograr, y (b) las limitaciones inherente en la técnica de elaboración de preparados farmacéuticos tal como compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Un intervalo no limitante, ilustrativo para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención es 0,1-20 mg/Kg., más preferiblemente 1-10 mg/Kg. Se debe observar que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y gravedad de la afección que tenga que ser mitigada. Se debe entender adicionalmente que para cualquier sujeto concreto, los regímenes de dosificación específicos se deben ajustar a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administre o supervise la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación expuestos en la presente memoria son meramente ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance o la práctica de la composición reivindicada.

II. Genes sensibles a IL-18

La IL-18 es expresada en macrófagos, células dendríticas, células de Kupffer, microglía, células epiteliales, queratinocitos, células del epitelio intestinal, condrocitos, fibroblastos sinoviales y osteoblastos, así como en la corteza suprarrenal y la glándula pituitaria. En algunas células, tales como monocitos humanos y células dendríticas, la expresión es constitutiva, mientras que en otras células debe ser inducida de novo. Aparte de la expresión del interferón gamma, poco se sabe acerca de otros genes inducidos por IL-18 sola o en concierto con otras citoquinas.

Una realización de la descripción proporciona un método para la regulación de la expresión génica de un gen de interés que comprende las etapas de proporcionar IL-18 o un modulador de IL-18; y poner en contacto IL-18 o el modulador con una célula donde el gen de interés se selecciona del grupo que consiste en los genes presentados en la siguiente tabla.

Tabla 3 Genes sensibles a IL-18

ID Genbank	Nombre del Gen	Comentario de Unigene
NM_000389	p21	inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1A (p21, Cip1)
NM_002198	IF1	factor 1 regulador de interferón
N_002163	ICSBP1	proteína de unión 1 a la secuencia consenso del interferón
NM_006144	GZMA	granzima A
NM_006515	SETMAR	dominio SET y gen de fusión de la transposasa mariner
NM_007185	TNRC4	4 que contiene repeticiones de trinucleótidos
NM_002288	LAIR2	receptor 2 de tipo Ig asociado a leucocitos
NM_003661	APOL1	apolipoproteína L, 1

ES 2 385 484 T3

ID Genbank	Nombre del Gen	Comentario de Unigene
NM_021958	HLX1	homeobox 1 de tipo H2.0 (Drosophila)
NM_001335	CTSW	catepsina W (linfopaina)
Hs.382006	FCGR1B	forma b de FcRI (AA 1-344)
NM_020125	BLAME	leucina aminopeptidasa 3
NM_007210	GALNT6	UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina
NM_021798	IL21R	receptor de interleuquina 21
NM_013324	CISH	proteína que contiene SH2 inducible por citoquina
M11313	A2M	alfa-2-macroglobulina
D88152	ACATN	transportador de acetil-Coenzima A
NM_001103	ACTN2	actinina alfa 2
U37519	ALDH8	aldehído deshidrogenasa 8
N_000697	ALOX12	araquidonato 12-lipoxigenasa
J03600	ALOX5	araquidonato 5-lipoxigenasa
NM_014578	ARHD	familia genes homólogos ras, miembro
S66793	ARR3	arrestina 3, retinal (X-arrestina)
U47054	ART3	ADP-ribosiltransferasa 3
L19871	ATF3	factor de activación de la transcripción 3
M81181	ATP1B2	ATPasa, transportador de Na ⁺ /K ⁺
NML001188	BAK1	antagonista de BCL2/killer 1
U15460	BATF	factor de Transcripción con cremalleras de leucina de carácter básico, de tipo ATF
NM_014417	BBC3	componente 3 de unión a Bcl-2
Z23115	BCL2L1	BCL2 de tipo 1
NM_001713	BHMT	metiltransferasa de betaína-homocisteína
U45878	BIRC3	que contiene 3 de la repetición IAP de baculovirus
U37546	BIRC3	que contiene 3 de la repetición IAP de baculovirus
U72649	BTG2	familia BTG, miembro 2
U49187	C60RF32	marco de lectura abierto 32 del cromosoma 6
J03507	C7	componente 7 del complemento
U50360	CAMK2G	quinasa II gamma CaM
XM_071866	CAT56	proteína CAT56
NM_005623	CCL8	
Z32765	CD36	antígeno CD36 (colágeno tipo I/receptor de TSP)
HG2981- HT3127	CD44	antígeno CD4
Z11697	CD83	antígeno CD83
XM_071866	ICDR2	proteína relacionada con la degeneración cerebelar (62kD)
U51096	CDX2	factor de transcripción de tipo homeobox 2
M83667	CEBPD	CCAAT/proteína delta de unión al potenciador (C/EBP)

ES 2 385 484 T3

ID Genbank	Nombre del Gen	Comentario de Unigene
D87469	CELSR2	cadherina, receptor 2 de tipo G EGF LAG de siete pasos
L07765	CES1	carboxilesterasa 1
U66468	CGR11	regulador del crecimiento celular con dominio en mano EF
X14830	CHRNB1	receptor colinérgico, nicotínico, polipéptido 1 beta
L29217	CLK3	quinasa 3 de tipo CDC
X15880	COL6A1	colágeno, tipo VI, alfa 1
NM_001851	COL9A1	colágeno, tipo IX, alfa 1
M27691	CREB1	proteína de unión 1 al elemento sensible a AMPc
M37435	CSF1	factor 1 estimulador de colonias (macrófago)
HG3548- HT3749	CUTL1	cut (proteína de desplazamiento de CCAAT)
X13589	CYP19	citocromo P450, subfamilia XIX
X16866	CYP2D7AP	citocromo P450, subfamilia IID
X59131	D13S106E	proteína altamente cargada
NM_004393	DAG1	distroglicano 1
U73328	DLX4	homeobox distal menos4
L19267	DMWD	distrofia miotónica, motivo repetitivo WD
U53445	DOC1	regulado a la baja en cáncer de ovario 1
X68277	DUSP1	fosfatasa 1 de especificidad dual
U48807	DUSP4	fosfatasa 4 de especificidad dual
NM_001950	E2F4	factor de transcripción E2F-4, unión a p107/p130
U87269	E4F1	factor de transcripción E4F-1
M57730	EFNA1	efrina-A1
X52541	EGR1	respuesta de crecimiento temprano 1
J04076	EGR2	respuesta de crecimiento temprano 2 (homólogo Krox-20)
X63741	EGR3	respuesta de crecimiento temprano 3
L07077	EHHADH	enoil-Coenzima A
M62831	ETR101	proteína temprana inmediata
M60830	EVI2B	sitio 2B de integración viral ecotrópica
U53786	EVPL	envoplaquina
NM_001988	EVPL	envoplaquina
N_000141	FCGBP	fragmento Fc de la proteína de unión a IgG
M23668	FDX1	ferredoxina 1
U60062	FEZ1	proteína zeta 1 de fasciculación y elongación (zingina I)
N_000141	FGFR2	receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos
U49973	FLJ10803	proteína hipotética FLJ10803

ES 2 385 484 T3

ID Genbank	Nombre del Gen	Comentario de Unigene
U89995	FOXE1	caja de la cabeza de tenedor E1 (factor 2 de transcripción tiroideo)
U27326	FUT3	fucosiltransferasa3
A28102	GABRA3	receptor de ácido gamma-aminobutírico (GABA)
M25667	GAP43	proteína 43 asociada al crecimiento
L34357	GATA4	proteína de unión GATA-4
U19523	GCH1	ciclohidrolasa 1 de GTP
L01406	GHRHR	receptor de la hormona liberadora de la hormona de crecimiento
U03486	GJA5	proteína de uniones en hendidura, alfa 5, 40kD (conexina 40)
X68285	GK	glicerol quinasa
Z18859	GNAT2	proteína de unión al nucleótido de guanidina (proteína G)
HG870-HT870	GOLGA3	autoantígeno golgi, subfamilia a de la golgina, 3
D49958	GPM6A	glicoproteína M6A
D43772	GRB7	proteína 7 de unión al receptor del factor de crecimiento
AC000099	GRM8	receptor de glutamato, metabotrópico 8
M57731	GRO2	oncogen GRO2
X53800	GRO3	oncogen GRO3
M91036	HBG2	hemoglobina, gamma G
D16583	HDC	histidina descarboxilasa
X64877	HFL3	factor H (complemento) tipo 3
X58431	HOXB6	homeobox B6
M16937	HOXB7	homeobox B7
NM_014468	HPX42B	homeobox progenitor hematopoyético
X92814	HREV107	similar a HREV107 de rata
L19314	HRY	homólogo de hairy (Drosophila)
M26665	HTN3	histatina 3
D10995	HTR1B	receptor 1B de 5-hidroxitriptamina (serotonina)
L41147	HTR6	receptor 6 de 5-hidroxitriptamina (serotonina)
M24283	ICAM1	molécula 1 de adherencia celular (CD54)
S81914	IER3	respuesta temprana inmediata 3
J03171	IFNAR1	receptor 1 de interferón (alfa, beta y omega)
J00219	IFNG	interferón, gamma
NM_000619	IFNG	interferón, gamma
NM_000585	IL15	interleuquina 15
U31628	IL15RA	receptor de interleuquina 15, alfa
X04500	IL1B	interleuquina 1, beta
M27492	IL1R1	receptor de interleuquina 1, tipo I

ES 2 385 484 T3

ID Genbank	Nombre del Gen	Comentario de Unigene
X01057	IL2RA	receptor de interleuquina 2, alfa
M26062	IL2RB	receptor de interleuquina 2, beta
Y00081	IL6	interleuquina 6 (interferón, beta 2)
Y00787	IL8	interleuquina 8
Z31695	INPP5A	inositol polifosfato-5-fosfatasa, 40kD
X06256	ITGA5	integrina, alfa 5
X57206	ITPKB	inositol 1,4,5-trisfosfato 3-quinasa B
U20734	JUNB	proto-oncogen jun B
NM_014879	KIAA0001	receptor acoplado a proteína G putativo para UDP-glucosa
D31762	KIAA0057	proteína
	KIAA0087	producto génico KIAA0087 de tipo TRAM
NM_005551	KIAA0133	producto génico KIAA0133
NM_014846	KIAA0196	producto génico KIAA0196
X06182	KIT	oncogen homólogo V-kit
NM_005551	KLK2	calicreína 2, prostática
X07730	KLK3	calicreína 3, (antígeno específico de próstata)
M13955	KRT7	queratina 7
M57710	LGALS3	lectina, unión a galactosidasa, soluble, 3 (galectina 3)
S83362	LIFR	receptor del factor inhibidor de leucemia
NM_002314	LIMK1	dominio quinasa 1 LIM
NM_005569	LIMK2	dominio quinasa 2 LIM
U49957	LPP	contiene dominio LIM
U89922	LTB	linfotóxina beta (superfamilia del TNF, miembro 3)
X14008	LYZ	lizozima (amiloidosis renal)
U59914	MADH6	homólogo 6 de MAD)
D14497	MAP3K8	proteína quinasa activada por mitógeno quinasa 8
X59727	MAPK4	proteína quinasa activada por mitógeno 4
NM_000429	MAT1A	metionina adenosiltransferasa, alfa
HG1877- HT1917	MBP	proteína básica de mielina
HG3115- HT3291	MBP	proteína básica de mielina
U43944	ME1	enzima málica 1, dependiente de NADP(+), citosólica
X72755	MIG	monoquina inducida por interferón gamma
NM_021230	IMLL3	leucemia 3 de linaje mielóide/linfóide o mixto
NM_005951	MT1H	metalotioneína 1H
X78710	MTF1	factor metal-regulador 1 de la transcripción
X70991	NAB2	proteína de unión 2 a NGFI-A (ERG1 pb 2)

ES 2 385 484 T3

ID Genbank	Nombre del Gen	Comentario de Unigene
M32011	NCF2	factor citosólico 2 de neutrófilos
S77763	NFE2	factor nuclear (derivado eritroide 2), 45kD.
M58603	NFKB1	factor nuclear kappa B (p105)
S76638	NFKB2	factor nuclear kappa B
M69043	NFKBIA	factor nuclear kappa B
U91616	NFKBIE	factor nuclear kappa B
D86425	NID2	nidógeno 2
L13740	NR4A1	subfamilia 4 del receptor nuclear, grupo A, miembro 1
U44848	NRF1	factor 1 nuclear respiratorio
U79251	OPCML	proteína de unión a opioides/tipo molécula de adherencia celular
HG4115-HT4385	OR1E3P	receptor olfatorio
M27288	OSM	oncostatina M
AF000234	P2RX4	receptor porinérgico P2X
D50640	PDE3B	fosfodiesterasa 3B, inhibida por GMPc
L20971	PDE4B	fosfodiesterasa 4B, específica de APMc
L10343	PI3	inhibidor de proteasa 3, derivada de piel (SKALP)
IU77735	PIM2	oncogen pim-2
NM_003579	PIP5K2A	fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa 011
U17034	PLA2R1	receptor 1 de fosfolipasa A2, 180kD
AB000584	PLAB	factor de diferenciación de próstata
X63131	PML	leucemia promielocítica
D11428	PMP22	proteína de mielina periférica 22
NM_032940	POLR2C	polipéptido de polimerasa (ARN) II
NM_005035	POLRMT	polimerasa (ARN) mitocondrial (dirigida a ADN)
NM_003579	POU2F2	dominio POU, clase 2, factor de transcripción 2
M18255	PRKCB1	proteína quinasa C, beta 1
L01087	PRKCQ	proteína quinasa C, theta
D38128	PTGIR	receptor (IP) de prostaglandina I2 (prostaciclina)
Y10375	PTPNS1	tirosina fosfatasa, sustrato 1 no receptor
D15049	PTPRH	proteína tirosina fosfatasa, tipo de receptor, H
M31166	PTX3	gen relacionado con la pentaxina,
U59877	RAB31	RAB31, miembro de la familia de oncogenes RAS
Nk_003579	RAD54L	RAD54 de tipo (S.cerevisiae)
U64675	RANBP2L1	RAN proteína de unión 2 tipo 1
S57153	RBBP1	retinoblastoma-proteína de unión 1
NM_002903	RCV1	recoverina
NG_000013	RDBP	proteína de unión a ARN RD

ES 2 385 484 T3

ID Genbank	Nombre del Gen	Comentario de Unigene
X75042	REL	v-rel
M83221	RELB	v-rel
NM_000537	REN	renina
U22314	REST	factor de transcripción silenciador de RE1
S59049	RGS1	regulador de la señalización de proteína G 1
U70426	RGS16	regulador de la señalización de proteína G 16
U22377	RLF	secuencia de fusión L-myc reordenada
U38480	RXRG	receptor X retinoide, gamma
IL10338	SCN1B	polipéptido del canal de sodio
M23178	SCYA3	citoquina A3 inducible pequeña
M69203	SCYA4	citoquina A4 inducible pequeña
NM_005409	SCYB11	subfamilia B de citoquina inducible pequeña: CXC11
D79206	SDC4	sindecano 4 (amfiglicano, riudocano)
NM_005065	SEL1L	sel-1 de tipo (supresor de lin-12, C.elegans)
NM_004186	SEMA3F	semaforina 3F
J03764	SERPINE1	nexina, inhibidor de tipo 1 del activador de plasminógeno
NM_006802	SF3A3	factor de empalme 3a, subunidad 3, 60kD
HG3925-HT4195	SFTPA2	proteína A2 asociada a los pulmones, tensioactiva
D89077	SLA	adaptador de tipo Src
No_003037	SLAM	molécula de activación linfocítica de la señalización
M91463	SLC2A4	transportador de glucosa de la familia 2 del portador de soluto
D82326	SLC3A1	familia 3 del portador de soluto
L05568	SLC6A4	familia 6 del portador de soluto (serotonina),
U96094	SLN	sarcolipina
X83301	SMA3	SMA3
D21267	ISNAP25	proteína asociada al sinaptosoma, 25kD
IL31529	SNTB1	proteína A1 asociada a sintropina, distrofina,
HG961-HT961	SOS1	hijo del homólogo 1 de sevenless (Drosophila)
M62800	SSA1	(52kD, autoantígeno de ribonucleoproteína SS-A/Ro)
NM_021014	SSX3	sarcoma sinovial, X punto de rotura 3
Z35093	SURF1	surfeit 1
NM_005816	TACTILE	activación células T, aumento de la expresión tardía
L25444	TAF2E	factor asociado a la proteína de unión de la caja TATA (TBP)
M95787	TAGLN	transgelina

ES 2 385 484 T3

ID Genbank	Nombre del Gen	Comentario de Unigene
NM_005421	TAL2	leucemia linfoctica aguda 2 de células T
L47345	TCEB3	factor B de elongación de la transcripción (110kD, elonguina A)
M57732	TCF1	factor nuclear hepático (HNF1)
NM_003205	TCF12	factor de transcripción 4 con motivo hélice-asa-hélice
M96956	TDGF1	factor de crecimiento 1 derivado de teratocarcinoma
U19878	TMEFF1	transmembrana con EGF y de tipo folistatina
M92357	TNFAIP2	proteína 2 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa
M59465	TNFAIP3	proteína 3 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa
X83490	TNFRSF6	miembro 6 del receptor del factor de necrosis tumoral
U37518	TNFSF10	miembro 10 del factor de necrosis tumoral
Nk_003294	TPSB1	triptasa beta 1
U19261	TRAF1	factor 1 asociado al receptor de TNF
U78798	TRAF6	factor 6 asociado al receptor de TNF
S69790	WASF3	familia de proteína WAS, miembro 3
U53476	WNT7A	familia del sitio de integración de MMTV de tipo sin alas
L15309	ZNF141	proteína con dedos de cinc 141 (clon pHZ-44)
U78722	ZNF165	proteína con dedos de cinc 165
HG4333-HT4603	ZNF79	proteína con dedos de cinc 79 (pT7)
X57809		región variable de la cadena ligera lambda
HG3111-HT3287		clon HH409 de Homo sapiens desconocido
U79249		secuencia del clon 23839 humano
AB000464		clon: RES4-24A
HG4593-HT4998		canal de sodio regulado por voltaje (SCN1A)
X77744		Homo sapiens para la proteína FLJ00032, parcial
U79248		secuencia del clon 23826 humano
AI420129		ESTs

El método de identificación de genes regulados por la IL-18 se describe en el Ejemplo 3. Estos estudios mostraron que IL-18 es a citoquina proinflamatoria auténtica y puede regular directamente la expresión de varios genes que codifican otros mediadores proinflamatorios: Estudios en los que se utilizan muestras de sangre humana muestran que muchas respuestas a IL-18 se producen abiertamente en la población humana y demuestran su utilidad como marcadores bioquímicos de IL-18, y como consecuencia de la función anti-IL18.

Los moduladores de IL-18 pueden ser agonistas y antagonistas. Preferiblemente el modulador es una proteína de unión o una proteína de unión neutralizadora.

Los inhibidores de IL-18 ilustrativos incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos, y fragmentos de los mismos, que se unen a IL-18; anticuerpos que se unen a IL-18R; anticuerpos que se unen a IL-18RAcP; IL-18bp; fragmentos de IL-18R (p. ej., un dominio extracelular solubilizado del receptor de IL-18); péptidos que se unen a IL-18 y reducen o previenen su interacción con IL-18R; péptidos que se unen a IL-18R y reducen o previenen su interacción con IL-18 o con IL-18RAcP; péptidos que se unen a IL-18RAcP y reducen o previenen su interacción con IL-18R; y moléculas pequeñas que reducen o previenen la producción de IL-18 o la interacción entre cualquiera de IL-18, IL-18R, e IL-18RAcP.

Algunos inhibidores de IL-18 se describen, p. ej., en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.912.324, expedida el 14 de Julio de 1994; el documento EP 0 962 531, publicado el 8 de Dic. de 1999; el documento EP 712 931, publicado el 15 de Nov. de 1994; la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.914.253, expedida el 14 de Julio de 1994; el documento WO 97/24441, publicado el 10 de Julio de 1997; la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.060.283, expedida el 9 de Mayo de 2000; el documento EP 850 952, publicado el 26 de Dic. de 1996; el documento EP 864 585, publicado el 16 de Sep. de 1998; el documento WO 98/41232, publicado el 24 de Sep. de 1998; la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.054.487, expedida el 25 de Abril de 2000; el documento WO 99/09063, publicado el 14 de Agosto de 1997; el documento WO 99/22760, publicado el 3 de Nov. de 1997; el documento WO 99/37772, publicado el 23 de Enero de 1998; el documento WO 99/37773, publicado el 20 de Marzo de 1998; el documento EP 0 974 600, publicado el 26 de Enero de 2000; el documento WO 00112555, publicado el 9 de marzo de 2000; la Solicitud de Patente japonesa JP 111.399194, publicada el 31 de Oct. de 1997; la Solicitud de Patente de Israel IL 121554 A0, publicada el 8 de Feb. de 1998.

Resultará fácilmente evidente para los expertos en la técnica que serán obvias otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de los métodos de la invención descritos en la presente memoria y se pueden realizar utilizando los equivalentes adecuados sin apartarse del alcance de la invención o las realizaciones descritas en la presente memoria. Habiendo descrito ahora la presente invención en detalle, la misma se entenderá más claramente mediante la referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen solo con fines ilustrativos y no se pretende que limiten la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción y Caracterización de IL-18 recombinante

Ejemplo 1.1: Análisis para determinar la actividad biológica de IL-18

A lo largo del Ejemplo 1 y el Ejemplo 2 los siguientes análisis se utilizaron para determinar la actividad biológica de IL-18 a no ser que se establezca lo contrario.

Ejemplo 1.1.A: Bioanálisis de KG-1

KG-1 (ATCC #CCL-246) es una línea celular mielomonocítica humana que expresa constitutivamente bajos niveles del receptor funcional de IL-18. El tratamiento con TNF regula al alza IL-18R α y las subunidades β del receptor funcional de IL-18 en estas células. El bioanálisis de KG-1 se realizó incubando células KG-1 tratadas con TNF con IL-18 humana recombinante (rhu-IL-18) y determinando el nivel de producción de IFN γ humano inducido por IL-18 por medio de un ELISA. (Konishi, K., et al (1997) J. Immunol. Methods 209:187-191). El bioanálisis de KG-1 se utilizó para determinar la potencia de neutralización de los antagonistas de IL-18. Por ejemplo, se incubaron anticuerpos anti-IL-18 con diferentes concentraciones de rhu-IL-18 y a continuación se incubaron con células KG-1 tratadas con TNF en una placa de 96 pocillos durante 16-18 horas a 37°C. Los sobrenadantes se recogieron y se analizaron para determinar los niveles de IFN γ humano por medio de un ELISA. Este análisis puede medir valores de CI50 por debajo de 4×10^{-11} - 6×10^{-11} M de un antagonista de IL-18.

Ejemplo 1.1.B: Análisis de Sangre Completa Humana

En resumen, el Análisis de Sangre Completa Humana (ASC) determina la potencia de neutralización de los antagonistas de IL-18 frente a IL-18 natural en un contexto fisiológico. En este análisis, la lectura fue la inhibición de la producción de IFN γ humano dependiente de IL-18 endógena. La sangre completa se estimuló con LPS (1 μ g/mL) más IL-12 (50 μ g/mL) en presencia o ausencia de antagonistas de IL-18 a 37°C. Las concentraciones de IFN γ humano se determinaron por medio de ELISA 18-24 hrs post-estimulación con LPS más IL-12.

Ejemplo 1.1.C: Análisis de Unión al Receptor

En resumen, en el Análisis de Unión al Receptor (AUR), se utilizó rhu-IL-18 marcada con I^{125} para determinar la unión de IL-18 al receptor de IL-18. La rhu-IL-18- I^{125} se une a específicamente a IL-18R $\alpha\beta$ en las células KG-1

tratadas con TNF (~7,000 sitios/célula). La rhu-IL-18-1²⁵ tiene la misma actividad específica que IL-18 no marcada y puede ser apartada de la competición por la IL-18 no marcada.

Se definieron dos modos de inhibición, A y B. En el Modo A de neutralización, no resultó afectada la unión de IL-18 al receptor de alta afinidad de IL-18 (IL-18R $\alpha\beta$), pero se bloqueó la transducción de la señal mediada por IL-18 (es decir la producción de IFN γ). En el Modo B de neutralización se bloqueó la unión de IL-18 a IL-18R $\alpha\beta$ y de ese modo no se produjo la consiguiente señalización mediada por el receptor.

Ejemplo 1.2: Producción de IL-18 recombinante

Ejemplo 1.2.A: Construcción del Plásmido, Expresión y purificación de proIL-18 humana

La IL-18 recombinante humana se generó expresando la forma precursora de IL-18 en células de insecto SF-9. Utilizando métodos de biología molecular convencionales bien conocidos en la técnica, se generó ADNc de pro-IL-18 humana completo utilizando cebadores específicos de PCR basados en la secuencia publicada (Ushio, S., et al. (1996) J. Immunol. 156:4274-4279) y se clonaron con posterioridad en el vector de transferencia (BV) de baculovirus pVL1393. (BD Biosciences, San Jose, CA; Núm. de Cat 51-21201P). El cebador de PCR 5' utilizado para generar el ADNc de pro-IL-18 humana completo contenía secuencias que codificaban una región 6-Histidina de manera que el extremo N de la proIL-18 contenía una etiqueta 6-HIS. Las células de insecto SF9 se infectaron con baculovirus que albergaban el vector pVL1393 que contenía el ADNc de IL-18. Las células SF9 infectadas se lisaron y los productos lisados se hicieron correr sobre una columna de níquel para purificar la pro-IL-18 (rhu pro IL-18) etiquetada con HIS (BD Biosciences, San Jose, CA; Núm. de Cat. 554802). La pro IL-18 etiquetada con HIS recombinante se procesó adicionalmente mediante digestión con caspasa-1 humana para generar IL-18 biológicamente activa (IL-18 madura). (Ghayur T., (1997) Nature 386:619-623).

Ejemplo 1.2.B: Tratamiento con NEM de IL-18

La IL-18 recombinante humana obtenida de Hayashibara Biochemical Laboratories, Japan, presentaba variación de la actividad específica entre lotes y en la afinidad de unión de IL-18. La IL-18 contenía enlaces disulfuro entre algunos pares de las cuatro cisteínas en la IL-18 madura. Estos causaron heterogeneidad estructural y funcional, y variaciones entre lotes. El modelado por homología de IL-18 humana utilizando coordenadas de IL-1b mostró que los residuos de cisteínas de las posiciones 38 y 68 de la IL-18 humana madura están expuestos y por lo tanto son reactivos.

La IL-18 recombinante humana del Ejemplo 1.2.A se trató con N-etilmaleimida (NEM) para proteger las cisteínas de la oxidación. NEM-IL-18 era monomérica, no formaba agregados, era estable, y conservaba una alta actividad específica a lo largo del tiempo. NEM-IL-18 conservaba epítopos neutralizadores debido a que los anticuerpos neutralizadores anti-huIL-18 se unían y neutralizaban NEM-IL-18. A pesar del tratamiento con NEM de IL-18, se preservaron los epítopos neutralizadores sobre NEM-IL-18 según se determina mediante la capacidad de los anticuerpos anti-IL-18 para neutralizar la actividad biológica de NEM-IL-18 y de IL-18 humana natural en ASC humana. Se utilizó NEM-IL-18 para la optimización y selección del análisis y la caracterización inicial de mAbs anti-IL-18 humana completamente humanos.

Ejemplo 1.2.C: Generación y caracterización del mutante 4C/A de IL-18

El mutante 4C/A de IL-18 se generó por medio de la mutación de los cuatro residuos de Cisteína en IL-18 madura a Alanina ("4GA-huL-18"). La comparación del mutante 4C/A de IL-18 con NEM-huL-18, como se resume en la Tabla 4 de más abajo, mostró que las propiedades biológicas y bioquímicas de las dos proteínas eran indistinguibles. Tanto el mutante 4C/A de IL-18 como NEM-huL-18 eran monoméricos mediante análisis de difracción de luz dinámica (DLS) y cromatografía de exclusión por tamaños (SEC), y similares en conformación y estabilidad física mediante análisis de dicroísmo circular. La actividad biológica del mutante 4C/A de IL-18 y de NEM-huL-18 fue la misma en el análisis KG-1, y ambas formas de IL-18 se unían a IL-18BP y a los anticuerpos anti-IL-18 con afinidad similar. 4C/A-huL-18 no fue objeto de inestabilidad oxidativa y se expresó fácilmente a altos niveles en *E. coli*.

Tabla 4 La Comparación de NEM-IL-18 y 4C/A-huL-18 muestra que tienen medidas equivalentes de pureza conformacional y oligomérica, estabilidad física, y unión a anticuerpos o a receptores unidos a la célula.

Propiedades	Mediciones	NEM-huL-18	(4C/A)-huL-18
Estado Oligomérico	SEC	Monomérico	Monomérico
	DLS	Monomérico	Monomérico
Confirmación	CD (barrido longitud de onda)	CD mínimo a 210 nm	CD mínimo a 210 nm

Propiedades	Mediciones	NEM-huIL-18	(4C/A)-huIL-18
Estabilidad	CD (barrido temperatura)	Estable hasta 40° C	Estable hasta 40° C
Bioactividad	producción de IFN γ por 2 ng/mL IL-18	IFN γ 8 ng/mL	IFN γ 8 ng/mL
Epítomos	Neutralización de la producción de IFN γ por un aglutinante de referencia	Neutralizado por IL-18BP-Fc, 125-2H y IL-18R α	Neutralizado por IL-18BP-Fc, 125-2H y IL-18R α
•	Biacore (K _D)	IL-18BP-Fc: 0,098 nM 125-2H: 0,2 nM 2,5(E)mg1: 0,3 nM	IL-18BP-Fc: 0,135 nM 125-2H: 0,2 nM 2,5(E)mg1: 0,2 nM

Ejemplo 1.2.D: Generación y caracterización de rhIL-18 Biotinilada (biot-IL-18)

5 La biotinylación de NEM-IL-18 del Ejemplo 1.2.B se realizó en residuos de lisina utilizando mecanismos convencionales bien conocidos en la técnica, (Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce, Rockford, IL; Núm. de Cat 21335), y la rhu-IL-18 biotinylada (biot-IL-18) obtenida era una mezcla heterogénea que contenía especies con 1, 2, 3, o 4 biotinas por huIL-18. Además, las especies con 2 o 3 biotinas por rhIL-18 fueron las especies principales en biot-IL-18. La biot-IL-18 era biológicamente activa, se unía a anticuerpos anti-IL-18 según se determina mediante ELISA, y fue neutralizada por todos los anticuerpos anti-huIL-18 neutralizadores sometidos a ensayo. La Biot-IL-18 se unía a
10 células KG-1 que expresan IL-18R $\alpha\beta$ sobre su superficie con alta afinidad, y la biot-IL-18 sobre la superficie de las células KG-1 se detectó mediante análisis FACS utilizando anticuerpos anti-biotina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO; Núm. de cat. B 3640). De este modo la biotinylación no interfiere en la unión al receptor y no enmascara los epítomos neutralizadores de rhIL-18.

Ejemplo 1.2.E: Generación y caracterización de rhIL-18 Marcada con I¹²⁵

15 Los residuos de lisina en NEM-IL-18 del Ejemplo 1.2.B se marcaron con I¹²⁵ utilizando las condiciones especificadas por Amersham (Piscataway, NJ; Núm. de Cat. IM5861). La IL-18 marcada con I¹²⁵ conserva su actividad específica, compete con IL-18 no modificada, y se une específicamente a IL-18R en células KG-1. La unión de IL-18 marcada con I¹²⁵ al receptor de IL-18 se bloqueó por medio de la neutralización de anticuerpos monoclonales anti-huIL-18.
20 Esta yodación no afectó a la unión al receptor de IL-18 y no enmascaró los epítomos neutralizadores en la IL-18. La IL-18 marcada con I¹²⁵ se utilizó para determinar el modo de neutralización y la potencia de los anticuerpos anti-IL-18 en el Análisis de Unión al Receptor.

EJEMPLO 2: Generación y aislamiento de anticuerpos anti-IL-18

Ejemplo 2.1: Análisis para identificar anticuerpos anti-IL-18

30 A lo largo del Ejemplo 3 se utilizaron los siguientes análisis para identificar y caracterizar anticuerpos anti-IL-18 a no ser que se establezca lo contrario.

Ejemplo 2.1.A: ELISA

35 Se desarrolló un ELISA para rastrear anticuerpos que se unen a IL-18 humana. En este ELISA, se capturó NEM-huIL-18 biotinylado (véase el Ejemplo 1.2.B) o bien con anti-IgG biotinylada de cabra o bien en placas recubiertas de estreptavidina. Se aplicaron sobrenadantes de hibridoma o células B y se detectaron los anticuerpos unidos a IL-18 utilizando anti-IgG humanas conjugadas con HRP, siguiendo protocolos de ELISA convencionales bien conocidos en la técnica.

Ejemplo 2.1.B: Determinaciones de afinidad utilizando la tecnología BIACORE

40 El análisis BIACORE (Biacore, Inc, Piscataway, NJ) determina la afinidad de los anticuerpos con mediciones cinéticas de las constantes de unión y desunión. Los anticuerpos se capturan sobre un chip biosensor por medio de un anticuerpo secundario unido covalentemente (p. ej. anti-IgG humana de cabra o anti-IgG de ratón) y a continuación se aplican concentraciones variables de IL-18 recombinante. La unión se registra como una función del tiempo y se calculan las constantes cinéticas de velocidad. En este análisis, se pueden medir constantes de unión tan rápidas como 10⁶M⁻¹s⁻¹ y constantes de desunión tan lentas como 10⁻⁶s⁻¹.

Ejemplo 2.1.C: Cartografiado Epitópico

50 Se utilizó la tecnología BIACORE se utilizó para cartografiar los epítomos reconocidos por antagonistas de IL-18 tales como los anticuerpos anti-IL-18. En resumen, un antagonista de IL-18 se capturó sobre el chip Biacore y rhIL-18 se

unió al reactivo inmovilizado. A continuación se sometió a ensayo la unión de otro antagonista anti-IL-18 a este complejo. La unión simultánea de dos reactivos demuestra que los dos reconocen epítomos diferentes.

Ejemplo 2.2: Generación de MAbs Anti-IL-18 Hu Utilizando XENOMOUSE

La tecnología del ratón transgénico XENOMOUSE (Abgenix, Inc., Fremont, CA) se empleó para obtener anticuerpos monoclonales anti-IL-18 humana completamente humanos (HuMAbs). Esta tecnología consiste en ratones transgénicos que portan el locus de la cadena pesada variable humana que portan VH, DH, y JH, Cmu, Cdelta y un solo locus de la cadena pesada constante de IgG humana y loci de genes de la cadena ligera. Después de la inmunización con un antígeno de interés, estos ratones generan anticuerpos completamente humanos contra el antígeno.

Ejemplo 2.2.A: Inmunización de XENOMOUSE con antígeno IL-18

Se inmunizaron animales XENOMOUSE vía ruta de almohadillas plantares para todas la inyecciones. El volumen total de cada inyección fue de 50 ul por ratón, 25 ul por almohadilla plantar. La inyección de inmunización contenía 40 ug de IL-18 humana (NEM-rhulL-18) en DPBS sin pirógeno mezclada 1:1 v/v con TiterMax Gold por ratón. Se realizaron refuerzos posteriores con 40 ug de IL-18 Humana en DPBS sin pirógeno mezclada con 25 ug de Adju-Phos (gel de fosfato de aluminio) por ratón seis veces, a continuación un refuerzo final de 40 ug de IL-18 Humana en DPBS sin pirógeno sin coadyuvante por ratón. Los animales se inmunizaron los días 0, 4, 8, 11, 17, 21, 25 y 35 durante este protocolo. Las fusiones se realizaron el día 39. Después del régimen de inmunización descrito anteriormente; se aplicó eutanasia a los ratones, a continuación se recuperaron los nódulos inguinales y Lumbares.

Ejemplo 2.2.B: Generación de Hibridomas

Los linfocitos se liberaron por medio de rotura mecánica de los nódulos inguinales y Lumbares, obtenidos de acuerdo con el Ejemplo 2.2.A, utilizando una trituradora de tejido, y agotando las células T mediante selección negativa de CD90. La fusión del hibridoma se realizó mezclando células B enriquecidas lavadas y células de mieloma no secretoras P3X63Ag8.653 adquiridas de ATCC, Núm. de Cat. CRL 1580 (Kearney et al, J. Immunol. 123, 1979, 1548-1550) a una razón de 1:1. La mezcla celular se sedimentó suavemente mediante centrifugación a 800 g. Después de la eliminación completa del sobrenadante, las células se trataron con 2-4 mL de solución Pronase (CalBiochem, San Diego, CA; Núm. de Cat. 53702; 0.5 mg/ml en PBS) durante no más de 2 minutos. A continuación se añadieron 3-5 ml de FBS para detener la actividad enzimática y la suspensión se ajustó a un volumen total de 40 ml utilizando una solución de electrofusión celular, ECFS (0,3M Sacarosa, Sigma-Aldrich, St Louis, MO; Núm. de Cat. S7903, Acetato de Magnesio 0,1 mM, Sigma, Núm. de Cat. M2545, Acetato de Calcio 0,1 mM, Sigma-Aldrich, St Louis, MO; Núm. de Cat. C4705). El sobrenadante se eliminó después de la centrifugación y las células se suspendieron en 40 ml de ECFS. Esta etapa de lavado se repitió y las células se volvieron a suspender en ECFS a una concentración de 2×10^6 células/ml. La fusión electro-celular se realizó utilizando un generador de fusión, modelo ECM2001, Genetronic, Inc., San Diego, CA. El tamaño de la cámara de fusión utilizada fue de 2,0 ml utilizando los siguientes ajustes instrumentales: Condición de alineamiento: voltaje: 50 v, tiempo: 50 s; Rotura de membrana a: voltaje: 3000 v, tiempo: 30 μ s; Tiempo de mantenimiento Post-fusión: 3 s.

Después de la fusión, las células se volvieron a suspender en medio de fusión de hibridoma: DMEM (JRH Biosciences), FBS al 15% (Hyclone), que contenía 0,5XHA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO; Núm. de Cat. A9666), y con un suplemento de L-glutamina, pen/estrep, OPI (oxaloacetato, piruvato, insulina bovina) (todos de Sigma) e IL-6 (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) para su cultivo a 37°C y 10% CO² en aire. Las células se cultivaron en placa en placas para el cultivo de tejido de 96 pocillos de fondo plano a 4×10^4 células por pocillo. Los cultivos se mantuvieron en medio de fusión de hibridoma durante 2 semanas antes de transferirlos a medio de Hibridoma: DMEM (JRH Biosciences, Lenexa, KS), FBS al 15% (Hyclone, Logan, Utah), y con un suplemento de L-glutamina, pen/estrep, OPI (oxaloacetato, piruvato, insulina bovina) (todos de Sigma) e IL-6 (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN). Los hibridomas se seleccionaron mediante la supervivencia en medio de fusión de hibridoma 0.5XHA y los sobrenadantes de los pocillos que contenían hibridomas se escrutaron para determinar la reactividad del antígeno por medio de ELISA. El formato de ELISA implicó la incubación de los sobrenadantes sobre placas recubiertas con antígeno (placas recubiertas de IL-18 humana) y la detección de los anticuerpos humanos que se unen a anti-IL-18 humana utilizando anti-IgG humana de ratón marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP), a continuación todas las muestras positivas se confirmaron mediante dos series de ELISA en paralelo, que implicó la incubación de los sobrenadantes sobre las placas recubiertas con antígeno (placas recubiertas con IL-18 humana) y la detección de los anticuerpos humanos que se unen a anti-IL-18 humana utilizando anti-cadena Gamma y Kappa humana de ratón marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP).

La clonación se realizó sobre pocillos positivos para el antígeno seleccionados utilizando cultivo en placa de dilución limitada. Las placas se inspeccionaron visualmente para detectar la presencia de crecimiento de una sola colonia y a continuación se escrutaron los sobrenadantes de los pocillos con una sola colonia mediante ELISA específicos del

antígeno como se ha descrito anteriormente. Los clones altamente reactivos se analizaron para verificar la pureza de la cadena gamma y kappa humana por medio de ELISA múltiplex utilizando un aparato Luminex.

Ejemplo 2.2.C: Tecnología XENOMAX

5 Alternativamente, los linfocitos obtenidos en Ejemplo 2.2.B se sometieron a un Método de generación de Anticuerpos de Linfocitos Seleccionados (SLAM; del Inglés Selective Lymphocyte Antibody-generation Method), que define la tecnología de selección de anticuerpos XENOMAX (Abgenix, Inc., Fremont, CA). Las células B individuales se cultivaron en placa en placas de 96 pocillos. Las células B que producen anticuerpos monoclonales humanos para un antígeno deseado (IL-18 humana) se identificaron por medio de un análisis celular formador de placa (Babcock, J.S., Leslie, K.B., Olsen, O.A., Salmon, R.A., y Schrader, J.W. Isolation of functional antibody genes from single lymphocytes of defined antigen-specificity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:7843-7848, 1996) y los genes de IgG se clonaron mediante RT-PCR de una sola células de células B aisladas utilizando cebadores 5' para secuencias líder de VH y Vk y cebadores 3' específicos para Cgamma y Ckappa humanas. Los genes de IgG recombinante obtenidos se expresaron en células de mamífero como se describe en los Ejemplos 2.2.E y 2.2.G.

Ejemplo 2.2.D: Identificación de los anticuerpos anti-IL-18

20 Los hibridomas y las células B que producen anticuerpos que se unen a IL-18, generados de acuerdo con los Ejemplos 2.2.B y 2.2.C, se identificaron utilizando ELISA para IL-18 biotinilada (véanse Ejemplo 2.1.A). A continuación los sobrenadantes de los hibridomas y células B que contenían los anticuerpos que se unen a IL-18 se sometieron a ensayo para determinar la potencia de neutralización de IL-18 en el bioanálisis KG-1 realizado de acuerdo con Ejemplo 1.1.A. Los anticuerpos neutralizadores anti-IL-18 (de los enfoques con hibridoma y SLAM) se subclonaron en un vector de expresión de mamífero, se expresaron en células COS, se purificaron y se volvieron a someter a ensayo en el bioanálisis KG-1 (véase la Tabla 5).

Tabla 5 Potencia de Neutralización de HuMAbs Anti-IL-18 en el Bioanálisis KG-1

Núm. HuMAb	Análisis KG-1 (CI ₅₀ , M)
	NEM-rhuIL-18
Hibridoma	
2.5.1	3E-10; 4E-10
2.13.1	2E-10; 1E-10; 7E-11
2.3.3	1E-9; 2E-10; 7E-10
XENOMAX	
215	1E-10; 3E-10; 1E-10;
444	1E-10; 2E-10; 2E-10
478	7E-10; 2E-9; 3E-10
435	8E-10; 7E-10; 4E-10;
413	1E-9; 7E-10; 7E-10
581	7E-10; 3E-10; 3E-9
231	1E-10; 3E-11; 2E-9
521	6E-10; 3E-10; 2E-9
336	7E-10
351	2E-10
490	5E-10
550	TBD
268	7E-9

Las regiones variables de los anticuerpos de la Tabla 5 se describen en la Tabla 1.

Ejemplo 2.2.E: Subclonación de HuMAbs anti-IL-18 neutralizadores en un vector de expresión de mamífero

Los genes para las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos se clonaron en vectores pCDNA (Invitrogen, Carlsbad, Ca) bajo el control del promotor de CMV siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos plásmidos con secuencias Gamma-2 y kappa genómicas humanas se utilizaron para cotransfectar células COS mediante electroporación con las cadenas pesada y ligera correspondientes a cada clon empleando condiciones normalizadas bien conocidas en la técnica.

Se dejó que las células se recuperaran, crecieran, y secretaran anticuerpos durante 72 horas en DMEM sin suero con un suplemento de glutamina. Los sobrenadantes de cultivo a continuación se recogieron, se aclararon mediante centrifugación y filtración, y se colocaron sobre resina de Proteína-A. Las columnas se lavaron con PBS, los anticuerpos se hicieron eluir con un tampón de bajo pH, y se neutralizaron rápidamente con solución de Tris 1M. Se cambió el tampón de las preps de anticuerpo por PBS en filtros rotatorios Amicon-30. La concentración y la pureza de los anticuerpos se analizaron por medio de espectrometría a una DO 280 y SDS-PAGE antes de someterlos a ensayo para determinar la potencia de neutralización de IL-18.

Para lograr niveles de expresión mayores de anticuerpos humanos en células COS, las cadenas pesada y ligera de algunos anticuerpos se subclonaron en el vector pEF-BOS (Mizushima, S. y Nagata, S. (1990) Nucleic acids Research Vol 18, No. 17) bajo el control del promotor del factor de elongación.

En resumen, se diseñaron cebadores de PCR para las regiones variables de las cadenas pesadas de tal modo que se pudieran insertar en un plásmido pEF-BOS con cassette que contenía un péptido señal de IgG y la secuencia de la región constante de IgG1 humana [tipo salvaje (SEQ ID No. 2) o un mutante inactivo (SEQ ID No.3)]. El cebador de PCR V_H directo contenía el sitio de restricción NruI, como también lo contenía la secuencia de nucleótidos del péptido señal. El cebador de PCR V_H inverso contenía el sitio de restricción Sall que también fue diseñado en el extremo 5' de la secuencia de Fc gamma-1. Los fragmentos de PCR V_H se digirieron con NruI/Sall y se clonaron en los constructos de IgG1 humana pEF-BOS de tipo salvaje o de IgG1 humana pEF-BOS mutantes. Los genes de la cadena ligera completos se movieron en el vector pEF-BOS en su formato Kappa existente desde los vectores pCDNA mediante digestión de restricción con HindIII, rellenando los salientes con polimerasa de T4, seguido de digestión con NotI. Estos fragmentos de la cadena ligera blunt/NotI se clonaron a continuación en el vector pEF-BOS digerido con SrfI/NotI.

Las regiones VH y VL de los anticuerpos se clonaron en las líneas de hibridoma originales. El ARN se preparó a partir de células productoras de anticuerpos, se realizó la RT-PCR con cebadores diseñados como se ha descrito anteriormente, i.e. cebadores NruI/Sall para V_H, y cebadores NruI/BsiWI para V_L. Las cadenas IgG1 y Kappa completas se ensamblaron en vectores con cassettes.

Los anticuerpos seleccionaron se modificaron adicionalmente. Los anticuerpos de origen natural tienen glutamina (Q) o glutamato (E) como extremo NH₂ de la cadena pesada y/o ligera. La producción de anticuerpos con Q como extremo NH₂ produce una heterogeneidad del extremo NH₂ debida a la ciclación del residuo de glutamina a glutamato. Por lo tanto, el residuo de glutamina en el extremo NH₂ de algunos de los anticuerpos se mutó a glutamato. Asimismo dos residuos, Leucina 234 y Leucina 235 en la región bisagra de la porción Fc, se mutaron a para prevenir las funciones efectoras del anticuerpo. En resumen, la Leucina 234 y la Leucina 235 se remplazaron cada una por un residuo de Alanina utilizando técnicas de biología molecular convencionales (Lund, J. et al., J. Immunology (1991) 147: 2657-2662; Winter, et al. Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.648.260; 5.624.821; 5.624.821). Estos anticuerpos con Fc mutada se denominaron (mg1). Estos mutantes se caracterizan adicionalmente en los Ejemplos 2.2.J 6, más abajo.

Ejemplo 2.2.F: Caracterización de anticuerpos anti-IL-18 Neutralizadores Seleccionados

Se produjeron varios anticuerpos anti-IL-18 humana recombinantes con distintas secuencias de la línea germinal en células de mamífero, se purificaron y se caracterizaron funcionalmente en diversos análisis (véase la Tabla 6).

Tabla 6: Unión de antígeno in vitro, análisis celular y características de la secuencia de la cadena principal de algunos anticuerpos anti-IL-18.

Anticuerpo	Tecnología ^a	Biacore ^b (K _D , nM)	RBA (CI ₅₀ , nM)	KG-1 ^a (CI ₅₀ , nM)	ASC (CI ₅₀ , nM)	Diversidad de Secuencia Familias de Genes ^c	
2.5(E)mg1	Hibridoma	0,31	2,38	0,20	3	VL-L2	VCH5-51
2.5(E)wtg1	Hibridoma	0,40	2,38	0,30	3	VL-L2	VHS-51
215(E)mg1 ^d	Xenomax	0,23	1,17	0,17	3	VL-27	VH4-31
444(Q)mg1 ^d	Xenomax	1,61	2,49	0,13	1	VL-A27(7)	VH4-31(1)
581(E)mg1 ^d	Xenomax	2,00	1,28	1,3	3	VL-A2	VH3-30

Anticuerpo	Tecnología ^a	Biacore ^b (K _D , nM)	RBA (CI ₅₀ , nM)	KG-1 ^a (CI ₅₀ , nM)	ASC (CI ₅₀ , nM)	Diversidad de Secuencia Familias de Genes ^c	
2.3.1(E)wtg1	Hibridoma	0,23	0,20	0,63	2	VL-02	VH4-59
2.13.1(E)wtg1	Hibridoma	0,20	0,20	0,12	2	VL-A27(8)	VH4-31(18)

Se utilizó rhuIL-18 protegida con NEM-cys.

Los números entre paréntesis indican diferencias en los aminoácidos del clon más próximo a la secuencia de la línea germinal

Ejemplo 2.2.G: Generación de Líneas de Células CHO que Producen 2.5(E)mg1

Se generaron líneas de células CHO estables que expresan el anticuerpo 2.5(E)mg1 siguiendo los procedimientos esbozados más abajo.

5

Ejemplo 2.2.G1: Construcción del Vector de Expresión

El plásmido pA510 se construyó para determinar el alto nivel de expresión de los anticuerpos en líneas celulares de mamíferos. Este plásmido derivado de pUC19 contenía el origen de replicación ColE1 de *E. coli* y el gen de la beta-lactamasa para la resistencia a la ampicilina.

10

En resumen, se clonaron los ADNc correspondientes a las regiones VH y VL del anticuerpo 2.5(E)mg1 utilizando técnicas de biología molecular convencionales, se fusionaron a los genes de la región constante gamma-1 y kappa humanos mutados, respectivamente, de manera que se produjera el ADN que codifica un anticuerpo IgG1/kappa completamente humano, nativo. Estos ADN se introdujeron en el constructo de expresión pA510. El plásmido resultante contenía secuencias (exclusivas de pUC19) para los siguientes genes o elementos reguladores en el siguiente orden: potenciador de 5'-CMV, promotor tardío principal de adenovirus, péptido señal de inmunoglobulina humana, región variable de inmunoglobulina de la cadena pesada de 2.5(E)mg1, región constante inmunoglobulina gamma-1 humana, secuencia de poliadenilación de SV40, secuencia de terminación de la transcripción de gastrina humana, origen de replicación de SV40 (promotor/potenciador de SV40), secuencia de dihidrofolato reductasa murina, secuencia de poliadenilación de la timidina quinasa del virus Herpes Simplex, potenciador de CMV, promotor tardío principal de adenovirus, péptido señal de inmunoglobulina humana, región variable de inmunoglobulina de la cadena ligera de 2.5(E)mg1, región constante kappa de inmunoglobulina humana, y secuencia de poliadenilación de SV40-3'. Las regiones codificantes se insertaron aguas abajo de los promotores virales fuertes que guiaban la transcripción de los genes del anticuerpo. El vector también codificaba la expresión del gen DHFR de ratón, que posibilitaba la selección de las células transformadas en virtud de su capacidad para crecer en cultivo en ausencia de nucleósidos.

15

20

25

Ejemplo 2.2.G 2: Transfección del Vector de Expresión a una Línea Celular Parental

30

La línea celular, CHO DUX B11. (Urlaub, G. y Chasin L.A. Proc Natl Acad Sci USA 77: 4216-4220 (1980)), carente de la expresión del gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR), se utilizó para la transfección del vector de expresión descrito en el Ejemplo 2.2.G 1. Se transfectaron células CHO DUX B 11 con el vector utilizando el método de precipitación con fosfato de calcio bien conocido en la técnica (Current Protocols in Molecular Biology; Ausubel, F.V., Brent, R., Moore, D.M., Kingston, R.E., Seidman, J.G., Smith, J.A., y K. Struhl eds; Wiley Interscience, N.Y., N.Y. (1990)) con las siguientes modificaciones. Las placas se aspiraron y se añadieron 9 ml de medio F12 a cada placa. Las placas se incubaron a 37°C durante dos horas. Se disolvieron 150 microgramos de ADN en 2,7 ml de agua en un tubo cónico de 50 ml. Se añadieron 300 microlitros de CaCl₂ 2,5 M y se añadió a la vez una gota de esta mezcla de ADN a 3 ml de 2 x solución salina tamponada Hepes (HeBS) en un tubo cónico de 50 ml.

35

40

La mezcla resultante se sometió a vórtice durante 5 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se distribuyó uniformemente 1 ml sobre cada placa (todavía en F12) y las placas se incubaron a 37°C durante cuatro horas. Después de la incubación, las placas se aspiraron, y se añadieron 2 ml de DMSO 10% en F12. El choque de DMSO continuó durante un minuto después de lo cual el DMSO se diluyó mediante la adición de 5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a cada placa. Las placas se aspiraron y se lavaron dos veces más en PBS. Se añadieron 10 ml de alfa MEM Gibco con nucleósidos y las placas se incubaron a 37°C durante la noche. El día siguiente, el medio se cambió a alfa MEM Gibco sin nucleósidos con suero bovino fetal (FBS) dializado al 5%, y seis horas más tarde las células se escrutaron en placas de 96 pocillos como sigue. Las células de las placas de 10 cm se cosecharon utilizando digestión con tripsina y se resuspendieron en un total de 300 ml de alfa MEM Gibco sin nucleósidos con suero al 5%. Se sembraron 20 placas de 96 pocillos a 10 ml/placa, 100 l/pocillo. Cien ml del mismo medio se añadieron a los 100 ml restantes de células y se sembraron 20 placa de 96 pocillos adicionales como antes. (Esta fue una segunda dilución). El medio se cambió en la placa de 96 pocillos una semana más tarde y de nuevo una semana después de eso. El medio alfa MEM sin nucleósidos se utilizó para seleccionar las células que expresan DHFR y por lo tanto el vector de expresión.

45

50

55

Ejemplo 2.2.G 3: Selección de células que producen 2.5(E)mg1

Se sometieron a ensayo sobrenadantes de cultivo de células CHO transfectadas para determinar la presencia de anticuerpo 2.5(E)mg1 secretado utilizando un ELISA específico para IgG humana. Una vez que se hubo escrutado un grupo de transfectantes CHO para determinar la expresión del anticuerpo humano, se utilizó una selección adicional para aislar esas células que habían amplificado el número de copias del vector de expresión integrado en el genoma CHO. El fármaco metotrexato (MTX) se utilizó para la selección de las líneas amplificadas. Los cultivos desarrollados en presencia de MTX se sometieron a ensayo para determinar su capacidad para producir inmunoglobulina. Las líneas resistentes a MTX que expresaban más anticuerpo que sus predecesores sensibles a MTX se llevaron a otro ciclo de selección en MTX de concentración más alta, y se sometieron a ensayo para determinar la producción de inmunoglobulina. Las células CHO que expresan 2.5(E)mg1 se cultivaron en un biorreactor de 1 o 15 litros y se determinó que el rendimiento de anticuerpo era de ~1,0 g/L en una ronda de dos semanas.

Ejemplo 2.2.H: Caracterización Físicoquímica de 2.5(E)mg1 Derivado de Células CHO

Se realizó preliminarmente la caracterización física y química de 2.5(E)mg1 derivado de CHO. El peso molecular determinado experimentalmente de 2.5(E)mg1 fue de aproximadamente 149 kDa, en buena concordancia con el peso molecular teórico. Utilizando técnicas de cartografiado de péptidos (K Biemann Annu. Rev. Biochem. 1992 61 977-1010; D A. Lewis Accelerated Articles, Anal. Chem. 1994, 66, 585-595) se confirmó que 2.5(E)mg1 tenía los extremos N correctos para las cadenas pesada y ligera. Hubo una variabilidad muy pequeña para el extremo C de la cadena pesada, puesto que 99% de las moléculas de 2.5(E)mg1 carecían de lisina en el extremo carboxi de la cadena pesada. Cada cadena pesada de 2.5(E)mg1 contenía un solo sitio de glicosilación conectado a N con oligomanosa y estructuras binatenarias fucosiladas complejas con 0, 1 o 2 residuos de galactosa terminales.

Ejemplo 2.2.I: Solubilidad y Estabilidad de 2.5(E)mg1 Derivado de Células CHO

El 2.5(E)mg1 purificado era soluble hasta al menos 62 mg/mL en tampones de pH 5, 6 y 7 durante un mínimo de 4 semanas. Se realizaron estudios acelerados de estabilidad con 2.5(E)mg1 a 37°C en estos tampones para identificar análisis que indicaran estabilidad y el óptimo de almacenamiento a largo plazo. Se tomaron muestras a intervalos semanales para su análisis por medio de HPLC de exclusión por tamaños y SDS-PAGE para someter a ensayo la agregación y la fragmentación, cartografiado de péptidos LC-MS/MS para la detección del enlace S-S, ELISA para el antígeno y/o bioanálisis basado en células para la medición de la actividad, y HPLC de intercambio catiónico y cuantificación iso-Asp para la medición de la heterogeneidad de carga. El análisis preliminar de las muestras mediante SEC (cromatografía de exclusión por tamaños), SDS-PAGE y cromatografía de intercambio catiónico mostró que los tres análisis indicaban estabilidad y por lo tanto 2.5(E)mg1 es más estable a -pH 6.

Ejemplo 2.2.J: Caracterización del HuMAb anti-IL-18 derivado de células CHO, 2.5(E)mg1**Ejemplo 2.2.J 1: Especificidad de Especie de IL-18**

Se evaluó la capacidad de 2.5(E)mg1 para unirse y/o neutralizar IL-18 de ser humano, mono cinomolgus, ratón, rata y perro. Utilizando el análisis BIACORE siguiendo las instrucciones del fabricante (véase el Ejemplo 2.1.B), se mostró que 2.5(E)mg1 se unía a IL-18 humana madura, pero no a IL-18 de ratón. Además, los datos de inmunoprecipitación mostraron que 2.5(E)mg1 se unía a IL-18 de mono cinomolgus (CI50 para IL-18 cino = $9,1E \times 10^{-11}$), pero no a IL-18 de perro o rata. 2.5(E)mg1 neutralizaba funcionalmente la bioactividad de IL-18 humana y de cinomolgus de una manera similar, pero no se observó la inhibición de IL-18 de perro, rata o ratón.

Ejemplo 2.2.J 2: Especificidad por Citoquinas Humanas

La especificidad de 2.5(E)mg1 por IL-18 se evaluó utilizando el análisis BIACORE siguiendo las instrucciones del fabricante (véase el Ejemplo 2.1.B). El anticuerpo 2.5(E)mg1 se capturó sobre el chip biosensor y se determinó su capacidad para unirse a un panel de citoquinas humanas conocidas en solución. Como se muestra en la Tabla 7, 2.5(E)mg1 se unía a IL-18 y pro-IL-18 madura humana recombinante. En contraste, 2.5(E)mg1 no se une a ninguna de las otras 23 citoquinas humanas sometidas a ensayo, incluyendo los miembros de la familia IL-1 IL-1 α e IL-1 β .

Tabla 7 Análisis Biacore de Unión a Citoquinas de 2.5(E)mg1

Citoquinas humanas rec. solubles, (1µM)	2.5(E)mg1 Capturado (25 mg/mL)
	Unión de 2.5(E)mg
IFN γ	-
IL-1 α	-
IL-1 β	-
Otras citoquinas ^a	-
IL-18 ^b	+
Pro-IL-18	+

^a Las citoquinas adicionales sometidas a ensayo para su unión incluyeron IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-21, TNF, LT, LT α 1 β 2, y LT α 2 β 1. 2.5(E)mg1 no se unen a ninguna de estas citoquinas. El mutante BV Cisteína > Alanina derivaba de IL-18 humana rec.

Ejemplo 2.2.J 3: Mediciones de la Afinidad

La Tabla 8 muestra las propiedades de unión a IL-18 *in vitro* de 2.5(E)mg1 medidas utilizando el análisis BIACORE de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El anticuerpo 2.5(E)mg1 tenía una velocidad de unión rápida, una velocidad de desunión lenta con una afinidad global de 0,196 nM. Los parámetros cinéticos de velocidad de dos antagonistas de referencia de IL-18 (proteína de unión a 125-2H e IL-18) se muestran para su comparación.

Tabla 8 IL-18 Propiedades de Unión 2.5(E)mg1 y Reactivos de Referencia

Reactivo	Parámetros Biacore		
	Velocidad de unión ($\times 10^3 M^{-1} s^{-1}$)	Velocidad de desunión ($\times 10^{-6} s^{-1}$)	K _D (nM)
2.5(E)mg1 ^a	268	52,4	0,196
anti-IL-18 humana murino (125-2H) ^b	190	110	0,550
IL-18BP-Fc ^c	140	26	0,190

(4C/A)-HuIL-18 se sometió a ensayo en BIACORE.
^b -125-2H, un mAb IgG1 anti-IL-18 humana de ratón neutralizador
^c -IL-18BP-Fc, una fusión Fc del antagonista natural de IL-18

Ejemplo 2.2.J 4: Potencia de Neutralización de IL-18 *In Vitro*

La potencia de neutralización *in vitro* de 2.5(E)mg1 se determinó en el bioanálisis KG-1, el análisis de unión al receptor (RBA) y el ASC humano (véanse los Ejemplos 1.1.A-1.1.C). Como se muestra en la Tabla 8 el anticuerpo 2.5(E)mg1 neutralizó tanto (KG-1 y RBA) recombinante como IL-18 natural (ASC), (CI₅₀ <0.5 nM en KG-1, <2 nM en RBA y <5 nM en ASC), y es congruente con su afinidad de unión a IL-18.

Tabla 8 Potencias de Neutralización de 2.5(E)mg1 y Reactivos de Referencia

Reactivo	Potencia de Neutralización in vitro (CI50, nM)		
	KG-1 ^a	RBA ^b	ASC ^c
2.5(E)mg1	0,2	2,4	3,0
mAb anti-IL-18 humana murino (125-2H)	0,2	>300 ^d	3,0
IL-18BP-Fc	0,03	1,0	5,7
mAb Anti-IL-18R (M-840)	1,5	1,7	2,7

^b bioanálisis KG-1, valores medios
^c en este análisis se utilizó (4C/A)-hulL-18
^d Análisis de Unión al Receptor
Análisis de Sangre Completa Humana con 4-6 donantes individuales. Se proporcionan los valores medios. 125-2H neutraliza la bioactividad de IL-18 a pesar del fracaso para inhibir la unión al receptor

Ejemplo 2.2.J 5: Potencia de Neutralización *In Vivo* de 2.5(E)mg1

5 Para evaluar la capacidad de 2.5(E)mg1 para neutralizar IFN γ inducido por IL-18 humana natural en un entorno inflamatorio in vivo, se utilizó el modelo de ratón inmunodeficiente (SCID) combinado severo, donde se inyectaban PBMC humanas en el ratón y las células se estimularon in vivo para producir IL-18 humana (modelo HuPBMC-SCID). Los resultados (Tabla 9) mostraron que 2.5(E)mg1 inhibía la producción de IFN γ dependiente de IL-18 humana in vivo con una clara dosis-respuesta mediante cualquier ruta de administración. La DE₅₀ de 2.5(E)mg1 fue de aproximadamente 1 μ g o 0,1 μ g/por ratón (=0,05 mg/kg o 0,005 mg/kg) mediante administración ip o iv, respectivamente.

Tabla 9A Eficacia *in vivo* de 2.5(E)mg1 administrado i.p. en un modelo de ratón de HuPBMC-SCID

15

<u>Grupo</u>	<u>hulFNγ</u> <u>(μg/ml)</u>	<u>%</u> <u>Inhibición</u>
2.5(E)mg1 0.025 μ g/ratón	70 \pm 17	61
2.5(E)mg1 0.25 μ g/ratón	112 \pm 29	36
2.5(E)mg1 2.5 μ g/ratón	36 \pm 10	80
2.5(E)mg1 25 μ g/ratón	10 \pm 8	94
2.5(E)mg1 250 μ g/ratón	3 \pm 2	98
Sin Tratamiento	193 \pm 59	
HulG Control 250 μ g/ratón	177 \pm 33	

Tabla 9B Eficacia *in vivo* de 2.5(E)mg1 administrado i.v. en un modelo de ratón de HuPBMC-SCID

<u>Grupo</u>		<u>hulFNq (pg/ml)</u>	<u>% Inhibición</u>
2.5(E)mg1 µg/ratón	0,025	156 ± 45	36
2.5(E)mg1 µg/ratón	0,25	27 ± 9	89
2.5(E)mg1 µg/ratón	2,5	36 ± 8	85
2.5(E)mg1 25 µg/ratón		11 ± 6	96
2.5(E)mg1 µg/ratón	250	4 ± 2	98
Sin Tratamiento		279 ± 26	
HulgG Control µg/ratón	250	245 ± 22	

Ejemplo 2.2.J 6: Funciones Efectoras

5 La porción Fc de un anticuerpo media varias funciones efectoras importantes p. ej. inducción de citoquinas, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), y vida media/velocidad de aclaramiento del anticuerpo y de los complejos antígeno-anticuerpo. En algunos casos estas funciones efectoras son deseables para el anticuerpo terapéutico pero en otros casos podría ser innecesario o incluso perjudicial dependiendo de los objetivos terapéuticos. Ciertos isotipos de IgG humana, particularmente IgG1 e IgG3, median la ADCC y la CDC a través de la unión a FcγRs y al complemento C1q, respectivamente. Los receptores de Fc Neonatales (FcRn) son los componentes críticos que determinan la vida media en circulación de los anticuerpos

15 Las mutaciones L234A y L235A en 2.5(E)mg1 no tuvieron influencia en la afinidad global o la potencia de neutralización de HuMAb 2.5(E)mg1 en comparación con 2.5(E)wtg1 (Tabla 10). Sin embargo, como se esperaba, estas mutaciones anularon la unión a FcγR y C1q.

Tabla 10: Mutaciones de residuos L234 y L235 a Alanina no afecta a la afinidad o a la potencia de neutralización de 2.5(E)mg1

Ab	Parámetros cinéticos de velocidad			Bioanálisis KG-1	
	Velocidad de unión ($10^3 M^{-1} s^{-1}$)	Velocidad de desunión ($\times 10^{-6} s^{-1}$)	K _D (nM)	IC ₅₀ (nM)	
2.5(E)wtg1	281	47,8	0,170	0,4	
2.5(E)mg1	268	52,4	0,196	0,2	

Ejemplo 2.2.J 6.1: Unión de FcγRI

25 El FcγR I humano (CD64) tiene una afinidad relativamente alta por los complejos inmunes de IgG1 (K_D 1E-8-1E-9 M). Se expresa en monocitos y macrófagos y varias líneas celulares mieloides incluyendo U937. La unión de 2.5(E)wtg1 y 2.5(E)mg1 a células U937 se determinó mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) (CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY. Vol (1) 5.3.1, Editado por J. E. Coligan et. al., Publicado por John Wiley & Sons, Inc., 2002). Los datos obtenidos (véase la Tabla 11) demostraron que 2.5(E)wtg1 se une a células U937, pero como se esperaba, 2.5(E)mg1 no. Para confirmar que esta unión estaba mediada por FcγR I, se utilizó un anticuerpo anti-hFcγR I bloqueador de ratón (10.1) para los experimentos de competición. El resultado demostró que el anticuerpo 10.1 bloqueaba la unión de 2.5(E)wtg1 a células U937 de una manera dependiente de la dosis a las concentraciones sometidas a ensayo más abajo, y de ese modo, 2.5(E)wtg1 se une a FcγR I en células U937.

35

Tabla 11. Demostración del fracaso de 2.5(E)mg1, en contraste con 2.5(E)wtg1, para unirse a FcγR I en células U937 (datos mostrados como IFM+/-DT)

Conc. de Anticuerpo (μM)	1.00E-09	1.00E-08	1.00E-07	1.00E-06	1.00E-05	1.00E-04	1.00E-03	1.00E-02	1.00E-01
2.5(E)wtg1	0,50+0,00	0,50+0,00	0,63+0,12	0,57+0,05	0,60+0,00	1,10+0,00	5,80+0,05	29,60+0,05	38,76+5,19
2.5(E)mg1	0,67+0,09	0,67+0,09	0,60+0,00	0,80+0,14	0,63+0,05	0,67+0,05	0,53+0,05	0,60+0,05	0,63+0,08

5 Ejemplo 2.2.J 6.2: Unión de FcγR II

El FcγR II humano (CD32) tiene una afinidad de unión relativamente baja por los complejos inmunitarios de IgG1 (K_D 1E-5-1E~7~M). En condiciones fisiológicas, requiere la formación de complejos inmunitarios multivalentes para su activación. Utilizando anticuerpos marcados con isotiocianato fluoresceína (FITC) específicos para FcγR I, II o III y la detección por medio de citometría de flujo, los autores de la presente invención validaron la expresión de FcγR II en células K562 y se utilizó esta línea celular para el análisis de unión de FcγR II. La unión de 2.5(E)wtg1 monomérico a células K562 fue muy débil. Por lo tanto, se utilizó un anticuerpo anti-cadena kappa para el entrecruzamiento previo de las moléculas de IgG1 para imitar los complejos inmunitarios multivalentes y se sometió a ensayo su unión a FcγR II en células K562. Después del entrecruzamiento, 2.5(E)wtg1 se unió a las células K562, pero incluso después del entrecruzamiento 2.5(E)mg1 solo mostró una unión mínima, si la hubiera (Tabla 12). Un anticuerpo anti-FcγR II, clon IV3, bloqueó la unión de 2.5(E)wtg1, y de ese modo, la unión de 2.5(E)wtg1 a K562 fue mediada por FcγR II.

20 Tabla 12. Unión de de 2.5(E)wtg1 y 2.5(E)mg1 a FcγR II en células K562 después del entrecruzamiento (datos mostrados como IFM+/-DT)

Conc. de Anticuerpo (μM)	1.00E-08	1.00E-07	1.00E-06	1.00E-05	1.00E-04	1.00E-03	1.00E-02	1.00E-01	1.00E+00
2.5(E)wtg1	0.37+0.05	0.37+0.05	0.40+0.00	0.43+0.05	0.80+0.08	3.43+0.21	19.7+0.70	93.33+4.90	134.37+12.93
2.5(E)mg1	0.30+0.00	0.40+0.00	0.40+0.00	0.37+0.05	0.37+0.05	0.40+0.00	0.50+0.00	1.60+0.08	5.37+0.38

Ejemplo 2.2.J 6.3: Unión de C1q

La activación del complemento y la lisis de las células a través de la ruta clásica se activa a través de la unión de C1q a la porción Fc de la molécula de IgG. La unión de C1q a 2.5(E)wtg1 y 2.5(E)mg1 se determinó utilizando mecanismos de ELISA convencionales conocidos en la técnica (Hezareh, M., et al., (2001) J. Virology, 75 (24):12161-12168). Los HuMAbs 2.5(E)wtg1 y 2.5(E)mg1 se aplicaron como recubrimiento sobre placas de plástico seguido de incubación con C1q humana. A continuación se detectó la unión de las moléculas de C1q por medio de una mezcla de anti-C1q humana de cabra y anti-IgG de cabra de conejo conjugada con fosfatasa alcalina. Los resultados mostraron que 2.5(E)wtg1 se unía a C1q, pero 2.5(E)mg1 no (Tabla 13).

35 Tabla 13. Demostración de fracaso de 2.5(E)mg1, en contraste con 2.5(E)wtg1, para unirse a C1q por medio de ELISA (datos mostrados como DO₄₀₅+/-DT)

Cono C1q 0 (μg/ml)	20	40	60	80	100	120
2.5(E)wtg1	0,09+0,00	0,78+0,00	0,98+0,00	1,06+0,07	1,14+0,06	1,32+0,13
2.5(E)mg1	0,10+0,01	0,12+0,00	0,16+0,00	0,18+0,00	0,21+0,01	0,22+0,00

Ejemplo 2.2.J 6.4: Unión al Receptor de Fc Neonatal (FcRn)

Se ha propuesto que la interacción de IgG con el receptor de Fc neonatal (también denominado receptor Bramble) en células endoteliales es un sistema de control de calidad de IgG y el determinante crítico para la larga vida media de las IgG [Ghetie, V., et al (1997) Nat. Biotechnol. 15:637-640]. Las moléculas de IgG absorbidas mediante pinocitosis y unidas satisfactoriamente a FcRn en vacuolas endocíticas se devuelven a la circulación. Las moléculas de IgG que fracasan en su unión a FcRn se degradan.

45 Los residuos críticos de IgG humana para la unión a FcRn se han cartografiado para determinar el empalme de los dominios CH2-CH3 (Kim J.K., et al (1999) Eur. J. Immunol. 29:2819-2825). De manera importante, estos residuos de

unión a FcRn residuos se conservan entre inmunoglobulinas humanas y de ratón y las inmunoglobulina humanas se unen a FcRn de ratón permitiendo estudios de relaciones de estructura-actividad en ratones.

5 Para someter a ensayo el efecto de las mutaciones L234A y L235A sobre la unión a FcRn, se determinó la unión de 2.5(E)wtg1 de tipo salvaje y de 2.5(E)mg1 mutante a FcRn *in vitro* utilizando una línea de células CHO que expresa FcRn. Se incubaron 2.5(E)wtg1 y 2.5(E)mg1 con las células CHO que expresan FcRn a pH 6,5, seguido de incubación con anti-IgG humana conjugada con FITC (2° Ab). Las células se lavaron y se analizaron mediante FACS.

10 La concentración 500 nM de 2.5(E)mg1 y 2.5(E)wtg1 mostró una unión significativa a FcRn en comparación con la concentración 0,5 nM, que era similar al antecedente con células solas.

Ejemplo 2.2.K: Farmacocinética en Ratones

15 Se evaluó la farmacocinética (PK) de 2.5(E)mg1 en un estudio de escrutinio en ratones para determinar si las mutaciones en Fc (L234A, L235A) introducidas para evitar que la unión de 2.5(E)mg1 a FcγR y C1q afectara adversamente al perfil de PK del suero. El FcRn de ratón se unió igualmente bien a IgG de ratón y humana haciendo del ratón una especie relevante para los estudios de relación estructura-actividad en ratones (Ober, R.J., et al (2001) *Int. Immunol.* 13:1551-1559). En ratones, se estimó que la vida media terminal de 2.5(E)mg1 era de 12 días. En
20 estudios similares, las vidas medias de otros anticuerpos monoclonales humanos fueron de 10 - 14 días.

Se evaluó la farmacocinética de 2.5(E)mg1 en ratones hembra (Jackson Labs, C57BL/6n) después de una única dosis intravenosa de 0,2 mg (equivalente a una media de 10 mg/kg). Se administraron dosis a un total de 24 ratones y se recogieron 3 muestras de cada ratón. El esquema de muestreo se prolongó durante 7 días. 2.5(E)mg1 mostró
25 una fase de distribución seguida de una fase de eliminación. Las estimaciones de la vida media de la distribución y la eliminación fueron de aproximadamente 1,6 horas y 12 días, basándose en un modelo abierto de dos compartimentos (Tabla 14).

30 **Tabla 14 Resumen de los parámetros farmacocinéticos de 2.5(E)mg1 derivados de una única dosis intravenosa en ratones**

t _{1/2α} (hr)	t _{1/2β} (días)	C _{max} (g/mL)	CL (mL/hr)	V _{ss} (mL)	V ₁ (mL)	V ₂ (mL)	MRT (días)	AUC (hr*µg/mL)
1,58	12,2	63,2	0,0162	6,82	3,15	3,67	17,5	12250

Modelos de Enfermedad

35 **Ejemplo 2.2.L: Efecto de anticuerpos anti-IL-18 en modelos de enfermedad**

Ejemplo 2.2.L.1: Inhibición de la producción de IFNγ inducida por LPS por mAbs anti-muIL-18

La producción de IFNγ inducida por LPS es dependiente de la expresión de IL-18 (Ghayur, T., et al, 1997. *Nature* 386:619-623). Se utilizó un análisis de producción de IFNγ inducida por LPS para determinar la eficacia de 93-10C para inhibir la producción de IFNγ inducida por LPS dependiente de IL-18 *in vivo*. Se administró a los ratones una
40 única dosis iv de 93-10C (50 µg). Treinta minutos más tarde los ratones fueron sensibilizados con LPS (20 mg/kg) y desangrados 4 horas más tarde. Se determinaron los títulos de IFNγ en suero por medio de ELISA. Como se muestra en la Tabla 15, 93-10C inhibía la producción de IFNγ inducida por LPS en ~70%.

45 **Tabla 15 93-10C inhibe la producción de IFNγ inducida por LPS *in vivo***

Grupo	muIFNγ (pg/ml)	% Inhibición
IgG de Rata 250 µg/ratón	7239 ± 365	N/A
MBT 93-10C 250 µg/ratón	2395 ± 711	67

Ejemplo 2.2.L.2: Inhibición de edema de almohadilla inducido por carragenano

50 La IL-18 está implicada en el reclutamiento de neutrófilos hacia sitios de inflamación. El edema de almohadilla plantar inducido por carragenano es un modelo de inflamación dependiente de monocitos y neutrófilos. El edema en este modelo puede ser inhibido significativamente neutralizando la actividad biológica de IL-18 (Leung, B.P., et al (2001) *J. Immunol.* 167:2879-2886). Se administraron a los ratones dosis (ip) de 1C5 (400 µg) (Hyashibara Laboratories, Japón) o 93-10C (100 µg) (Medical and Biological Laboratories (MBL) Co. Watertown MA.) o

anticuerpos de control y después se inyectó carragenano (sc) en las almohadillas plantares posteriores. El edema inducido por el carragenano fue medido diariamente desde las 24 h a las 96 h. 1C5 y 93-10C suprimieron significativamente el edema inducido por carragenano (inhibición ~50%) desde las 24h a las 96 h post sensibilización (Tabla 16). Además de bloquear la infiltración de neutrófilos, 93-10C también bloquea la expresión de TNF en el lugar de la inflamación en este modelo (Leung, B.P., et al (2001) J. Immunol. 167:2879-2886)).

Tabla 16 Supresión *in vivo* del edema de la almohadilla inducido por carragenano

Carragenano	Cambio en la Hinchazón de la Almohadilla (mm)			
	24	48	72	96
Tiempo (hrs)				
125-2H @ 400	0,357	0,557	0,543	0,414
1C5 @ 400 ug	0,214	0,300	0,286	0,200
IgG de Rata @ 100 ug	0,300	0,500	0,550	0,450
93-10C @ 100 ug	0,157	0,271	0,243	0,157
P<0,05 vs. IgG de Control				

Ejemplo 2.2.L.3: Artritis inducida por colágeno

La artritis reumatoide (AR) se caracteriza por inflamación crónica de las articulaciones, y, pérdida de hueso y cartilago articular. Aunque se piensa que la AR es una enfermedad autoinmunitaria, el autoantígeno implicado no ha sido identificado y la etiología precisa de la enfermedad es desconocida. La artritis inducida por colágeno (AIC) es un modelo ampliamente utilizado de AR y tiene características histopatológicas que son similares a las de la enfermedad humana (Bendele, A., et al (1999) Toxicol Pathol. 27:134-142; Trentham, D.E. et al (1977) J. Exp. Med. 146:857-868). En este modelo, se inmunizan ratones o ratas genéticamente susceptibles con colágeno de tipo II (CII) en coadyuvante completo de Freund. La poliartritis resultante se caracteriza por la destrucción del cartilago, resorción ósea, sinovitis, e inflamación periarticular (Bendele, A., et al (1999) Toxicol Pathol. 27:134-142). Los ratones IL-18 KO sobre un fondo DBA/1 mostraron una disminución de la incidencia y la gravedad de la AIC cuando se compararon con ratones de tipo salvaje (Wei, X.Q., et al (2000) J. Immunol. 166:517-521).

Para abordar el papel de la IL-18 endógena en la patogénesis de la AIC, se trataron ratones con una IgG policlonal de conejo (BA77) que neutraliza la IL-18 de ratón. Cuando se administró la dosis durante 14 días a partir del momento del cebado, BA77 retrasaba el comienzo de la enfermedad y daba como resultado una disminución de la gravedad de la enfermedad. BA77 también inhibía significativamente la producción de anticuerpos anti-colágeno IgG2a. Estos resultados son similares a los referidos para ratones IL-18 KO y confirman un papel para IL-18 como una importante citoquina pro-inflamatoria en la AIC temprana.

Los datos de ratones IL-18 KO y ratones de tipo salvaje tratados con IgG anti-IL-18 indican que IL-18 juega un importante papel pro-inflamatorio durante la activación de células T primarias inducida por CII. Para una mejor comprensión del papel de IL-18 durante el comienzo de la AIC, se inmunizaron ratones con CII y el tratamiento con IgG de rata o 93-10C se inició justo antes del comienzo de la enfermedad, que se produce alrededor del día 14. El tratamiento con 93-10C dio como resultado un retraso significativo del comienzo de la enfermedad y de la gravedad cuando se comparó con IgG de rata de control (Tabla 17). Estos datos demuestran que la IL-18 es un factor significativo no solamente en el cebado de las células T sino también en la promoción de respuestas artritogénicas después de la activación de células T específicas de CII.

Tabla 17 El mAb anti-IL-18 93-10C retrasaba el comienzo y disminuía la gravedad de la AIC

Tratamiento	Puntuación Artrítica media							
Día	11	12	13	14	15	16	17	18
IgG de Rata @ 200 µg	0,00	0,13	0,13	0,13	0,27	0,53	1,20	1,20
93-10C @ 200 µg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,20	0,47
Dexametasona-21-P @ 1 mpk	0,00	0,00	0,27	0,27	0,13	0,13	0,13	0,47
Período de Tratamiento								
P< 0,05 vs. IgG de Rata								

Tratamiento	Puntuación Artrítica media							
Día	19	20	21	22	23	25	26	27
IgG de Rata @ 200 µg	1,53	1,73	1,93	2,27	2,53	4,20	4,27	4,53
93-10C @ 200 µg	0,47	0,80	1,00	1,00	1,13	2,20	2,27	2,87
Dexametasona-21-P @ 1 mpk	0,07	0,07	0,07	0,00	0,00	0,00	0,07	0,20
Período de Tratamiento								
P < 0,05 vs. IgG de Rata								

Ejemplo 2.2.L.4: Artritis Séptica

La IL-18 es un factor importante en la patogénesis de un modelo de ratón de artritis séptica. Generalmente no se piensa que éste sea un modelo AR, pero comparte ciertos componentes inflamatorios y patología relacionada con la AR. En este modelo, la enfermedad es inducida inyectando estreptococos vivos del grupo B (GBS) en las articulaciones de las rodillas. La gravedad de la artritis resultante se corresponde con niveles tanto locales como sistémicos de IL-1 β e IL-6, pero no de TNF (Tissi L., et al (1999) Infect. Immunol. 67:4545-50). Se detectaron niveles significativos de IL-18 en las articulaciones tan pronto como a las 12 horas de la inyección con serotipo IV (GBS) seguido de una producción pico de IL-18 después de 5 días (-550 pg/ml en tratados con 1C5 vs -30 pg/ml en control con IgG). Se detectaron niveles elevados de IL-18 en el suero el día 5 después de la inyección (-180 pg/ml en tratados con 1C5 vs -20 pg/ml en control con IgG).

Cuando se inyectó 1C5 1 hora antes de la administración de GBS hubo una inhibición marcada en la frecuencia de lesiones articulares desde el día 2 al día 10 (índice artrítico: 1,0 en tratados con 1C5 vs 2,5 en control con IgG). Además, el tratamiento con 1C5 también dio como resultado una reducción significativa en los niveles de citoquina en las articulaciones incluyendo IL-6 a IL-1 β . (Datos no mostrados).

Ejemplo 2.2.L. 5: LEG

Los modelos más estudiados de lupus implican cepas de ratones (MRL/lpr y NZB/NZW F1) que desarrollan espontáneamente síndrome de tipo lupus con glomerulonefritis grave, producción de auto-anticuerpos (anti-ADN, anti-RNP etc.), esplenomegalia, linfadenopatía, y en cierta medida artritis y vasculitis. La afectación del riñón se observa normalmente a los 3-5 meses de edad, progresa rápidamente, y a los 6-10 meses es fatal. Ambas cepas de ratón han sido estudiadas exhaustivamente para adquirir conocimiento de esta enfermedad clínica.

Se seleccionó el modelo de ratón NZB/NZW F1 (B/W) (The Jackson Laboratory, Maine, EEUU) como el modelo más relevante para evaluar los efectos de la IL-18 exógena sobre el progreso de la enfermedad de tipo lupus. El comienzo del progreso de la enfermedad en ratones B/W se observa normalmente a los 7-9 meses de edad y a los 12-14 meses es fatal como resultado de la insuficiencia renal. Para investigar el papel de la IL-18 en la patogénesis del lupus, se trataron los ratones B/W diariamente con r-mulL-18 o control de vehículo empezando a los 7 meses de edad. Se evaluó la función del riñón determinando el grado de proteinuria. El tratamiento diario de los ratones B/W con 50 µg/kg de IL-18 condujo a un comienzo acelerado de la proteinuria grave en comparación con el grupo tratado con vehículo de PBS. Los ratones B/W tratados con IL-18 también mostraron una muerte acelerada. Estas observaciones fueron coherentes con las descritas más arriba para los ratones MRL/lpr y subrayan un papel pro-inflamatorio para la IL-18 en una enfermedad autoinmunitaria.

Para investigar el efecto terapéutico del bloqueo por IL-18 en un modelo de ratón de LEG, se estableció un protocolo de tratamiento de inducción-mantenimiento en ratones B/W que recapitula la terapia clínica para la nefritis por lupus. En este estudio, ratones B/W gravemente nefríticos recibieron 5 dosis semanales de Citoxan (fase de inducción) seguido de tratamiento crónico con 1C5 o control con IgG1 de ratón (125-2H) (fase de mantenimiento).

Los resultados demuestran que en los 130 días siguientes de tratamiento de mantenimiento, 1C5 prolongó significativamente la supervivencia de los ratones BW en comparación con la IgG1 125-2H de control. 125-2H es un mAb IgG1 de ratón que no reconoce mulL-18 (P < 0,05,). Además de la prolongación de la supervivencia, el comienzo de la proteinuria grave se retrasó, y hubo una reducción de IgG2a e IgG1 anti-ADNdh en los ratones BW tratados con 1C5. La reducción de anti-ADNdh por el tratamiento con 1C5 fue transitoria y no estadísticamente significativa. Se detectó anticuerpo contra 1C5 (anticuerpo anti-ratón de ratón [MAMA]), y precedió la pérdida de eficacia después del día 130, como evidenció la caída precipitada en la supervivencia y la pérdida de efecto en la reducción del título de anti-ADNdh y la proteinuria. En conclusión, a pesar de la presencia de respuestas de los anticuerpos a 1C5, el bloqueo de IL-18 por 1C5 prolongó la supervivencia, retrasó el comienzo de la proteinuria grave, y redujo los títulos de anti-ADN dh en ratones B/W. Estos datos demuestran un papel para IL-18 en la promoción de las respuestas inflamatorias dando como resultado una pérdida de la función del riñón y por último la muerte.

55

Ejemplo 2.2.L. 6: Esclerosis Múltiple

Se investigó la contribución de IL-18 a la patogénesis de la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE; un modelo murino de EM). Se considera que la EAE remitente-recurrente es un modelo relevante para la enfermedad humana debido al transcurso similar de la enfermedad, los signos clínicos, y la patología del SNC. En estos estudios, se indujo la enfermedad en ratones IL-18 KO y ratones WT C57/B16. Los ratones IL-18 KO mostraron un ligero retraso en el comienzo de los síntomas de la enfermedad en comparación con los ratones WT, y desarrollaron una enfermedad significativamente menos grave en momentos más tardíos (Tabla 18). El tratamiento de los ratones WT con BA77 (IgG anti-IL-18 de ratón (250 mg, 2X / semana), del día 0 al día 14 después de la inmunización retrasó el comienzo de los síntomas de la enfermedad y limitó significativamente la gravedad de la enfermedad en momentos más tardíos (Tabla 18). El efecto protector de la IgG anti-IL-18 podía ser observado en momentos más tardíos incluso después de cesar el tratamiento.

Tabla 18 Ratones tratados con Ab anti-IL-18 y ratones con IL-18 desactivada desarrollan una enfermedad EAE menos grave

		Puntuación Clínica Media Día 14 Después de la Inmunización
EAE inducida por PLP en ratones SJL/J	ab anti-IL-18 IgG(BA77)	4 2,7
		Puntuación Clínica Media Día 18
EAE Inducida por MOG en Ratones IL-18 KO y WT	WT KO	3,6 2,1

Ejemplo 2.2.L.7: Lesión en el Hígado

La inflamación/lesión del hígado inducida por Concanavalina A (Con A) es un modelo animal de enfermedad hepática mediada por células T. La activación de células T intra-hepáticas por Con A conduce a la producción local de mediadores inflamatorios (p. ej. IFN γ y ligando de Fas). La interacción Fas-ligando de Fas da como resultado la producción de IL-18 que induce adicionalmente la producción de IFN γ , ligando de Fas y TNF. De este modo, se establece un bucle de retroalimentación positivo que da como resultado la lesión del hígado y la producción excesiva de enzimas hepáticas tales como ALT y AST desde las células que están muriendo. Se inyectaron (ip) los mAAb 1C5 o 93-10C (ip) 1h antes de la administración iv de 150 μ g de Con A. Los ratones se desangraron 24 horas después de la inyección de Con A y se determinaron los títulos en suero de las enzimas hepáticas (ALT y AST). Tanto 1C5 como 93-10C bloquearon la elevación de las enzimas hepáticas inducida por LPS, aunque 93-10C fue eficaz a dosis más bajas (Tabla 19).

Tabla 19 Inhibición *in vivo* de la inflamación del hígado inducida por ConA por 93-10C

Tratamiento	AST	stdv	ALT	stdv
PBS	57	16	30	2
ConA sola	1138	416	1294	481
ConA+93-10C (50 ug)	183	70	153	88
ConA+93-10C (12,5 ug)	635	427	443	256
ConA+ IgG1 de rata (50 ug)	3924	1062	3455	753

Ejemplo 2.2.L.8: Sepsis

La IL-18 ha emergido como un importante mediador del choque endotóxico. La IL-18 puede ser un mediador crítico del fallo pulmonar, hepático y multiorgánico inducido por endotoxinas (Neeta, M.G., et al (2000) J. Immunol. 164:2644-2649). Este efecto de la IL-18 puede ser dependiente de su capacidad para regular la producción de mediadores citotóxicos así como su capacidad para activar respuestas inmunitarias innatas y reclutar neutrófilos hacia el sitio de la inflamación local. Además, la sensibilización con LPS induce niveles elevados de IFN γ , TNF e IL-1 en suero y estas citoquinas pueden contribuir a la letalidad inducida por LPS. Los ratones con IL-18 desactivada sensibilizados con LPS carecían de IFN γ inducido por LPS y producían significativamente menos TNF e IL-1 que los ratones WT (Takeda, K., et al. (1998) Immunity 8:383-390).

Se realizaron experimentos de letalidad inducida por LPS como sigue. Se pesaron los animales el Día 0 y se determinó la dosis apropiada que se iba a administrar. At T = -1 hora, se inyectaron a los animales anticuerpos anti-IL-18 o anticuerpos de control en 500 µl de solución salina al 0,9%, Intraperitoneal (IP). A T = 0, se inyectaron a los animales 20 mg/kg de lipopolisacárido (LPS) (E. coli serotipo 0111:B4 Sigma Núm. Cat. L-4130 lote núm. 71K4110) en 100 µl de solución salina al 0,9%, Intravenosa (IV). Cuatro horas más tarde se obtuvo sangre de los animales por medio de punción cardíaca. Se determinó el título de mIFN γ en suero por medio de ELISA para mIFN γ (R&D Systems).

Los ratones WT tratados con mAb anti-muL-18, 1C5 o 93-10C, se protegieron de la letalidad inducida por LPS (Tabla 20) (125-2H, que tiene el mismo isotipo inactivo que 1C5 pero no se une a muL-18, sirvió como control). Además, se informó de que los ratones tratados con IgG anti-IL-18 tuvieron una reducción de la lesión del pulmón y el hígado después de la sensibilización con LPS y esto se correspondía con una reducción de la acumulación de neutrófilos (Neeta, M.G., et al (2000) J. Immunol. 164:2644-2649).

Tabla 20 Los mAb 1C5 y 93-10C evitan la letalidad por una dosis elevada de LPS

Letalidad	Porcentaje de Supervivencia									
	0	8	24	32	48	56	72	120	144	
Tiempo (hrs)										
Solución salina	100	100	100	50	10	10		10	10	
125-2H @ 400	100	100	80	70	10	10	10	10	10	
1C5 @ 400 µg	100	100	100	90	80	80	80	80	80	

Letalidad	Porcentaje de Supervivencia									
	0	8	24	32	48	56	72	120	144	
Tiempo (hrs)										
Solución salina	100	100	90	40	10	10	10	10	10	
IgG de rata @ 100 µg	100	100	100	100	70	40	40	40	40	
93-10C @ 100 µg	100	100	100	100	100	100	100	100	100	

Ejemplo 2.2.M: Cristalización de fragmento Fab de 2.5(E)

Para demostrar que los anticuerpos de la invención pueden ser cristalizados de manera que se pueden generar formulaciones y composiciones que comprenden el anticuerpo cristalizado, se acometieron los siguientes experimentos.

Ejemplo 2.2.M.1: Preparación y Purificación del Fragmento Fab del Anticuerpo 2.5(E)

Se expresó IgG humana 2.5(E) en células CHO en Medio SR-286. El sobrenadante después de la lisis se filtró a través de un filtro de 0,5 micras y se cargó sobre una columna de Proteína A previamente equilibrada en Tampón A para Proteína A (1XPBS). Después se hizo eluir la IgG con Tampón B para Proteína A (Acetato de Na 0,1 M pH 3,5, NaCl 150 mM). La IgG reunida se concentró a 20 mg/ml, se mezcló con suspensión en gel de papaína al 50%, y se incubó a 37°C durante 24 horas con sacudimiento vigoroso. La mezcla de anticuerpo/suspensión se sometió a diálisis después frente a tampón Tris 50 mM pH 7,0 durante la noche a 4°C para eliminar la cisteína del tampón. Se preparó una columna de afinidad de Proteína A – Sefarosa 4 Fast Flow de 25 mL (Amersham Pharmacia) lavando con 100 mL de Tampón A (Tris 50 mM pH 7,0). El sobrenadante sometido a diálisis se aplicó a la columna de afinidad (velocidad de flujo 2 mL/min). Las fracciones de Fab de 2.5(E) (controladas por medio de absorbancia UV a 280 nm) se recogieron en el descarte. Las fracciones que contenían una concentración de Fab de 2.5(E) mayores de 0,3 mg/mL (determinada por medio de la absorbancia UV a 280 nm) se reunieron y se concentraron a -20 mg/mL utilizando un dispositivo de filtro de centrifuga con corte de peso molecular de 10 kDa (MWCO) Ultrafree-15 Biomax (Millipore) y se congelaron a -80°C. Esta muestra concentrada se utilizó en los experimentos cristalográficos descritos más abajo. La pureza de la muestra se evaluó con SDS-PAGE.

Ejemplo 2.2.M.2: Cristalización del Fragmento Fab de 2.5(E)

Se descongeló sobre hielo la solución de partida de Fab de 2.5(E) congelada (-20 mg/mL). El Fab (2 µL) se mezcló con 2 µL de una solución reservorio que consistía en polietilenglicol 400 (PEG) al 25-30%, CAPS 100 mM pH 10,5 y se suspendió sobre el reservorio en la cara inferior de un cubreobjetos de vidrio siliconizado a aproximadamente 4°C. En un día aparecieron cristales de tipo varilla. Se determinó que los cristales de tipo varilla eran cristales del fragmento Fab de 2.5(E) (Datos no mostrados).

Ejemplo 3: Genes sensibles a IL-18**Ejemplo 3.1: Materiales y Métodos**

5 A lo largo de todo el Ejemplo 4, se utilizan los siguientes materiales y métodos a menos que se establezca de otro modo.

Ejemplo 3.1.A: Tratamiento Celular y Preparación de ARN**10 Ejemplo 3.1.A.1: Células KG-1**

Se utilizaron aproximadamente $3,0 \times 10^7$ KG1 células (ATCC núm. CCL-246) para cada condición experimental en los cuatro grupos de tratamiento. En el primero, las células se trataron con 50 ng/mL de IL18 recombinante con o sin una preincubación de 30 min. con 10 mg/mL de cicloheximida. Después de 30 min. o dos horas las células se cosecharon para obtener el ARN. En el segundo, las células se trataron con 0, 0,5, 2,0, 10 o 50 ng/mL de IL18 recombinante con o sin una preincubación de 30 min. con 10 mg/mL de cicloheximida. Después de dos horas las células se cosecharon para obtener el ARN. En el tercero, las células se trataron con 0 o 10 ng/mL de TNF. Después de incubar durante la noche, las células se trataron con 0, 0,5, 2,0, 10 o 50 ng/mL de IL18 recombinante con o sin una preincubación de 30 min. con 10 mg/mL de cicloheximida. Después de dos horas las células se cosecharon para obtener el ARN. En el grupo de tratamiento final, las células se trataron simultáneamente con 0 o 10 ng/mL de TNF y 0 o 2,0 ng/mL de IL18 recombinante con o sin una preincubación de 30 min. con 10 mg/mL de cicloheximida. Después de dos horas las células se cosecharon para obtener el ARN.

Se preparó el ARN total utilizando Reactivo TRIZOL (Life Technologies, Rockville, MD). Se llevó a cabo una fase de separación inicial de acuerdo con el protocolo del fabricante y estuvo seguida de una extracción adicional utilizando medio volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1, Life Technologies, Rockville, MD). La precipitación y el lavado del ARN se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del protocolo TRIZOL del fabricante. Se sometieron a electroforesis aproximadamente 3 microgramos de ARN sobre un gel desnaturante de agarosa/formaldehído al 1,0% para evaluar la calidad.

Para los experimentos que requieren la preincubación con TNF, se incubaron las células KG-1 durante 12 horas con 2 ng/ml de TNF antes de la estimulación con 2, 10 o 40 ng/ml de IL18. El ARN se preparó como se ha descrito más arriba.

35 Ejemplo 3.1.A.2: Análisis de sangre humana completa

Se introdujeron alícuotas de 2,5 mL de sangre humana completa en tubos cónicos de 15mL y se trataron con IL18, IL12, IL18+IL12, IL18+IL12+anti-IL18 o IL18+IL12, IL18+IL12+anticuerpo de control. Las concentraciones finales fueron las siguientes: 500 pg/mL de IL12, 50 ng/mL de IL18(YK27-1), 5 ug/mL de mIgG, 5ug/mL de anti-IL18 1252H, y 2,5-4ug/mL de anti-IL18. Las mezclas se incubaron a 37°C durante cuatro horas con inversión intermitente suave. Después de la incubación, se separaron los glóbulos rojos utilizando cloruro de amonio añadiendo 5mL de 1 X tampón de lisis (PharM Lyse Ammonium Chloride Lysing Reagent diluido 1:10 en Depc). Después de 5 minutos sobre hielo la mezcla se centrifugó a 1200 rpm durante cinco minutos. Este procedimiento se repitió una vez produciendo un sedimento de color blanco de leucocitos sanguíneos. El ARN se aisló con posterioridad utilizando el procedimiento del Trizol descrito más arriba. Para el análisis de micro-matrices, todos los volúmenes de las muestras se incrementaron en un factor de cuatro.

Ejemplo 3.1.B: Preparación de la Sonda e Hibridación con la Diana

50 Se utilizaron diez microgramos de ARN total y el SuperScript Choice System for cDNA Synthesis (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) para sintetizar el ADNc de doble hebra. La síntesis se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo Affymetrix (Santa Clara, CA), que requiere cebadores oligoméricos T7-(dT)₂₄ (GENSET) en lugar del oligo (dT) o cebadores al azar proporcionado con el kit e incubaciones a 42°C durante el ajuste de la temperatura y las etapas de síntesis de la primera hebra. El ADNc resultante se limpió con tubos de 2 ml Phase Lock Gel Light (Eppendorf AG, Hamburg, DE), y el sedimento se suspendió en 12 µL de DEPC-H₂O. Se utilizaron 5 µL del ADNc junto con el Kit BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit (Enzo, Farmingdale, NY) para producir dianas de ARNc marcadas con biotina por medio de transcripción *in vitro* (IVT) a partir de promotores de ARN polimerasa T7. Los nucleótidos libres se separaron de la reacción IVT con Minicolumnas RNeasy (Qiagen, Hilden, DE). Después se fragmentaron 15 µg de ARNc marcado con biotina de acuerdo con el protocolo Affymetrix. La muestra fragmentada completa se combinó con 5 µL de oligonucleótido B2 de control (Affymetrix), 15 µL de 20X Control de Hibridación Eucariótico (Affymetrix), 3 µL de ADN de esperma de salmón sometido a sonicación (10 mg/mL, Stratagene, La Jolla, CA), 3 µL de BSA acetilado (50 mg/mL, Gibco BRL), 150 µL de 2X tampón de hibridación MES, y agua a un volumen final de 300 µL. Siguiendo el protocolo Affymetrix, las Matrices Genechip HuGeneFL (Affymetrix) se humedecieron

previamente con 1X MES. Los cócteles de hibridación se calentaron después y se centrifugaron, y se cargaron 200 µL sobre los chips. Los chips se centrifugaron en un horno asador durante 16 horas.

Ejemplo 3.1.C: Matrices de Sondas para el Lavado, Tinción, y Barrido

El cóctel de hibridación se separó de los chips y se reemplazó por tampón de lavado no restrictivo. Los chips se lavaron y se tiñeron utilizando el protocolo EukGE-WS2 en GeneChip Fluidics Station 400, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Affymetrix); un protocolo que coloreaba los chips tanto con solución de coloración de Estreptavidina Ficoeritrina (SAPE) como con solución de anticuerpo. Todos los tampones de lavado y los colorantes necesarios se prepararon de acuerdo con los protocolos de Affymetrix. Se utilizó un Escáner GeneArray (Agilent, Palo Alto, CA) junto con el programa GeneChip (Affymetrix) para el barrido de las matrices coloreadas.

Ejemplo 3.1.D: Análisis de los Datos

Los datos de Genechip fueron transferidos desde Affymetrix MAS4 a Microsoft Excel después se cargaron en Spotfire Decisionsite 7.0.

Ejemplo 3.2: Expresión génica regulada por IL-18

Ejemplo 3.2.1: IL18 sola regula directamente una cohorte de genes en células KG1.

Para determinar los transcritos regulados directamente por IL18, se realizaron experimentos de titulación de citoquina utilizando células KG1 en presencia y ausencia del inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida. En la Tabla 1 se muestran 62 transcritos representados por 67 grupos de sondas diferentes (debido a las redundancias en el chip) que se encontró que habían sido regulados dos veces o más con un valor de p menor de 0,05 (utilizando el test de la t de Student) al menos en una condición en presencia y en ausencia de cicloheximida. Estos genes comprendían una variedad de categorías funcionales incluyendo factores de transcripción, quinasas, y proteínas secretadas. Debido a que estos genes son regulados sin síntesis de proteínas de novo, estos genes responden directamente a la señalización inducida por IL18. Doce genes codifican proteínas secretadas, y trece codifican moléculas de la superficie (haciendo éstas dianas de anticuerpo viables). El resto de los genes codifican proteínas nucleares y citoplásmicas (véase la Tabla 21).

Tabla 21. Genes inducidos por IL18.

ID Genbank	Localización /función	Nombre del Gen	Comentario de Unigene	0.5 ng/ml	2 ng/ml	10 ng/ml	50 ng/ml
L29217	quinasa	CLK3	quinasa 3 de tipo CDC	9,1	7,4	8,1	15,0
D14497	quinasa	MAP3K8	proteína quinasa activada por mitógeno quinasa 8	6,6	2,9	5,8	3,9
L19871	ninguna	ATF3	factor de activación de la transcripción 3	1,0	1,1	3,3	2,6
U15460	ninguna	BATF	factor de Transcripción con cremalleras de leucina de carácter básico, de tipo ATF	1,5	1,7	2,4	2,8
U45878	ninguna	BIRC3	que contiene 3 de la repetición IAP de baculovirus	7,0	6,2	10,2	10,0
U37546		BIRC3	que contiene 3 de la repetición IAP de baculovirus	29,4	26,9	76,6	63,6
U72649	ninguna	BTG2	familia BTG, miembro 2	3,1	4,7	6,6	5,9
L07765	ninguna	CES1	carboxilesterasa 1	1,0	1,3	2,1	2,1
M27691	ninguna	CREB1	proteína de unión 1 al elemento sensible a AMPc	0,9	2,4	4,9	3,1
HG3548-HT3749	ninguna	CUTL1	cut (proteína de desplazamiento de CCAAT)	2,5	2,1	1,3	0,7
X59131	ninguna	D13S106E	proteína altamente cargada	2,1	0,5	1,5	2,3
U53445	ninguna	DOC1	regulado a la baja en cáncer de ovario 1	2,0	3,3	3,0	3,8

ES 2 385 484 T3

ID Genbank	Localización /función	Nombre del Gen	Comentario de Unigene	0.5 ng/ml	2 ng/ml	10 ng/ml	50 ng/ml
X68277	ninguna	DUSP1	fosfatasa 1 de especificidad dual	2,5	3,1	4,1	3,3
U48807	ninguna	DUSP4	fosfatasa 4 de especificidad dual	2,0	2,3	2,9	2,0
X52541	ninguna	EGR1	respuesta de crecimiento temprano 1	15,5	12,7	32,4	20,3
X63741	ninguna	EGR3	respuesta de crecimiento temprano 3	5,9	7,3	15,1	9,0
L07077	ninguna	EHHADH	enoil-Coenzima A	3,4	2,3	1,8	2,5
M62831	ninguna	ETR101	proteína temprana inmediata	3,4	5,8	6,3	6,8
L19314	ninguna	HRY	homólogo de hairy (Drosophila)	2,3	2,5	2,3	2,0
S81914	ninguna	IER3	respuesta temprana inmediata 3	17,0	18,6	32,9	29,6
X51345	ninguna	JUNB	proto-oncogen jun B	7,2	6,1	10,7	9,6
U20734	ninguna	JUNB	proto-oncogen jun B	10,2	21,8	25,0	25,4
U49957	ninguna	LPP	contiene dominio LIM	2,2	1,1	2,0	1,9
M58603	ninguna	NFKB1	factor nuclear kappa B (p105)	1,6	2,0	2,9	2,3
S76638	ninguna	NFKB2	factor nuclear kappa B	1,7	2,2	3,5	4,3
M69043	ninguna	NFKB1A	factor nuclear kappa B	9,6	10,4	15,5	15,8
U91616	ninguna	NFKBIE	factor nuclear kappa B	11,6	14,8	20,7	21,0
L13740	ninguna	NR4A1	subfamilia 4 del receptor nuclear, grupo A, miembro 1	2,0	2,7	2,4	2,5
HG4115-HT4385	ninguna	OR1E3P	receptor olfatorio	4,5	12,0	4,2	4,1
L20971	ninguna	PDE4B	fosfodiesterasa 4B, específica de APMc	2,4	2,8	4,2	3,5
U64675	ninguna	RANBP2L1	RAN proteína de unión 2 tipo 1	1,1	1,8	2,2	2,2
S57153	ninguna	RBBP1	retinoblastoma-proteína de unión 1	2,5	3,4	5,0	4,1
X75042	ninguna	REL	v-rel	1,6	2,5	3,9	3,7
M83221	ninguna	RELB	v-rel	2,3	2,8	2,8	2,6
S59049	ninguna	RGS1	regulador de la señalización de proteína G 1	10,9	12,7	22,4	17,8
U70426	ninguna	RGS16	regulador de la señalización de proteína G 16	3,9	4,7	7,5	6,7
U22377	ninguna	RLF	secuencia de fusión L-myc reordenada	2,5	2,0	2,5	2,6
M95787	ninguna	TAGLN	transgelina	6,6	4,7	1,0	1,6
L47345	ninguna	TCEB3	factor B de elongación de la transcripción (110kD, elonguina A)	3,6	5,3	2,3	4,2
M59465	ninguna	TNFAIP3	proteína 3 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa	9,9	12,4	25,4	20,6
U19261	ninguna	TRAF1	factor 1 asociado al receptor de TNF	2,8	2,8	4,9	4,1
U78798	ninguna	TRAF6	factor 6 asociado al receptor de TNF	1,2	2,0	2,1	2,2
M37435	secretada	CSF1	factor 1 estimulador de colonias	2,9	2,9	2,1	27,0
M57731	secretada	GRO2	(macrófago) oncogen GRO2	15,2	20,9	26,3	27,0

ID Genbank	Localización /función	Nombre del Gen	Comentario de Unigene	0.5 ng/ml	2 ng/ml	10 ng/ml	50 ng/ml
X53800	secretada	GRO3	oncogen GRO3	4,1	5,5	14,8	9,9
X04500	secretada	IL1B	interleuquina 1,	2,2	3,4	5,7	4,7
M28130	secretada	IL8	interleuquina beta 8	6,2	10,0	13,4	14,5
Y00787	secretada	IL8	interleuquina 8,	5,8	7,4	8,3	8,5
U89922	secretada	LTB	linfotoxina beta (superfamilia del TNF, miembro 3)	5,0	5,7	11,0	12,8
M31166	secretada	PTX3	gen relacionado con la penlaxina, rápidamente inducido por IL-1 beta	3,1	5,2	10,3	6,4
M23178	secretada	SCYA3	citoquina A3 inducible pequeña	1,8	2,0	5,0	3,8
M69203	secretada	SCYA4	citoquina A4 inducible pequeña	0,9	1,9	7,0	5,6
J04130	secretada	SCYA4	citoquina A4 inducible pequeña	1,0	2,6	5,9	4,5
M92357	secretada	TNFAIP2	proteína 2, inducida por el factor de necrosis tumoral alfa	4,2	6,4	20,3	19,3
Z32765	superficie	CD36	antígeno CD36 (colágeno tipo I/ receptor de TSP)	1,6	2,0	1,4	1,2
Z11697	superficie	CD83	antígeno CD83	4,7	8,2	19,6	16,7
M57730	superficie	EFNA1	efrina-A1	9,8	6,0	9,5	15,2
A28102	superficie	GABRA3	receptor de ácido gamma-aminobutírico (GABA)	3,0	2,5	1,6	2,7
M24283	superficie	ICAM1	molécula 1 de adherencia celular (CD54)	7,5	11,5	14,5	13,9
M55024	superficie	ICAM1	molécula 1 de adherencia celular (CD54)	2,5	3,4	3,2	3,7
J03171	superficie	IFNAR1	receptor 1 de interferón (alfa, beta y omega)	3,2	2,5	2,8	2,6
X01057	superficie	IL2RA	receptor de interleuquina 2, alfa	0,7	0,4	3,9	3,6
L10338	superficie	SCN1B	polipéptido del canal de sodio	1,8	2,3	1,5	1,5
D79206	superficie	SDC4	sindecano 4 (amfiglicano, riudocano)	4,0	4,2	7,2	6,1
HG961-HT961	superficie	SOS1	hijo del homólogo 1 de sevenless (Drosophila)	6,3	6,2	9,1	9,9
X83490	superficie	TNFRSF6	miembro 6 del receptor del factor de necrosis tumoral	1,1	1,3	3,8	3,3
U19523	ninguna	GCH1	ciclohidrolasa 1 de GTP		2,1		
U37518	superficie	TNFSF10	miembro 10 del factor de necrosis tumoral	1,4	1,4	2,3	1,6

Ejemplo 3.2.2: Efectos históricos de la exposición a citoquinas Respuesta de las células KG-1 a IL-18.

- 5 Puesto que típicamente las citoquinas aparecen de manera sucesiva durante una respuesta inmunitaria, se sometió a ensayo el efecto de preincubar células KG-1 con TNF antes del tratamiento con IL18. Este experimento también sometió a ensayo la hipótesis de que la historia de exposición de las células a citoquinas puede tener efecto sobre su respuesta a una posterior exposición a citoquinas. Las células se trataron con 2 ng de TNF 12 horas antes de añadir IL18 y se cosecharon cuatro horas más tarde.
- 10 La IL18 regulaba la expresión de aproximadamente 125 genes en estas condiciones (Tabla 2). Los criterios de filtración utilizados para obtener este grupo de genes fue un cambio menor del 50% debido al TNF y un cambio mayor de dos veces o mayor debido a IL18 a 10 ng/mL y 40 ng/mL. Estos genes comprendían una variedad de

categorías funcionales incluyendo factores de transcripción, quinasas, y proteínas secretadas (Tabla 22). En contraste con otras condiciones sometidas a ensayo aquí, los autores de la presente invención encontraron que el ARNm del interferón gamma y la proteína eran inducidos por IL18 después de la exposición a TNF.

5

Tabla 22. Genes regulados por IL18 después del tratamiento con TNF.

ID Genbank	Nombre del Gen	Comentario de Unigene	Veces 10 ng	Veces 40 ng
J00219	IFNG	interferón, gamma	26,3	31,8
U17034	PLA2R1	receptor 1 de fosfolipasa A2, 180kD	29,6	28,7
M57710	LGALS3	lectina, unión a galactosidasa, soluble, 3 (galectina 3)	27,5	25,4
X97748	PTX3	gen relacionado con la pentaxina, inducido por IL-1	15,2	13,6
M27288	OSM	oncostatina M	23,1	12,0
X57809		región variable de la cadena ligera lambda	10,9	10,0
Y00081	IL6	interleuquina 6 (interferón, beta 2)	9,2	9,4
D16583	HDC	histidina descarboxilasa	8,0	9,4
X07730	KLK3	calicreína 3, (antígeno específico de próstata)	5,6	8,8
HG3111-HT3287		clon HH409 de Homo sapiens desconocido	9,5	7,5
M57732	TCF1	factor nuclear hepático (HNF1)	2,0	7,2
U77735	PIM2	oncogen pim-2	7,1	7,1
U96094	SLN	sarcolipina	12,2	6,1
D50640	PDE3B	fosfodiesterasa 3B, inhibida por GMPc	4,0	5,4
X14008	LYZ	lisozima (amiloidosis renal)	3,0	5,4
M91036	HGB2	hemoglobina, gamma G	3,4	5,4
X72755	MIG	monoquina inducida por interferón gamma	5,2	5,2
AC000099	GRM8	receptor de glutamato, metabotrópico 8	2,3	4,3
D11428	PMP22	proteína de mielina periférica 22	5,0	4,0
M83667	CEBPD	CCAAT/proteína delta de unión al potenciador (C/EBP)	4,3	4,0
L19267	DMWD	distrofia miotónica, motivo repetitivo WD	3,0	3,8
M81181	ATP1B2	ATPasa, transportador de Na ⁺ /K ⁺	3,5	3,8
U79249		secuencia del clon 23839 humano	3,1	3,7
U49973	FLJ10803	proteína hipotética FLJ10803	3,2	3,6
HG870-HT870	GOLGA3	autoantígeno golgi, subfamilia a de la golgina, 3	3,5	3,6
X13589	CYP19	citocromo P450, subfamilia XIX	3,0	3,5
AB000464		clon: RES4-24A	2,9	3,5
M96956	TDGF1	factor de crecimiento 1 derivado de teratocarcinoma	2,6	3,5
U31628	IL15RA	receptor de interleuquina 15, alfa	6,4	3,3
D38128	PrGIR	receptor (IP) de prostaglandina 12 (prostaciclina)	8,8	3,3
J03507	C7	componente 7 del complemento	2,3	3,1
M32011	NCF2	factor citosólico 2 de neutrófilos	3,5	3,0
X63131	PML	leucemia promielocítica	4,7	3,0
D82326	SLC3A1	familia 3 del portador de soluto	4,0	3,0
L10343	PI3	inhibidor de proteasa 3, derivada de piel (SKALP)	2,1	3,0

ES 2 385 484 T3

ID Genbank	Nombre Gen del	Comentario de Unigene	Veces 10 ng	Veces 40 ng
U89995	FOXE1	caja de la cabeza de tenedor E1 (factor 2 de transcripción tiroideo)	2,6	2,9
M62800	SSA1	(52kD, autoantígeno de ribonucleoproteína SS-A/Ro)	3,1	2,9
AB000584	PLAB	factor de diferenciación de próstata	2,4	2,8
U37519	ALDH8	aldehído deshidrogenasa 8	2,2	2,7
D21267	SNAP25	proteína asociada al sinaptosoma, 25kD	2,2	2,7
M25667	GAP43	proteína 43 asociada al crecimiento	2,5	2,7
L34357	GATA4	proteína de unión GATA-4	2,3	2,7
U43944	ME1	enzima málica 1, dependiente de NADP(+), citosólica	3,0	2,7
M16937	HOXB7	homeobox B7	2,9	2,6
U27326	FUT3	fucosiltransferasa 3	2,6	2,6
Z23115	BCL2L1	BCL2 de tipo 1	2,2	2,6
HG1877- HT1917	MBP	proteína básica de mielina	2,4	2,6
D10995	HTR1B	receptor 1B de 5-hidroxitriptamina (serotonina)	2,5	2,6
M91463	SLC2A4	transportador de glucosa de la familia 2 del portador de soluto	3,1	2,5
U19878	TMEFF1	transmembrana con EGF y de tipo folistatina	2,9	2,4
U66468	CGR11	regulador del crecimiento celular con dominio en mano EF	2,2	2,4
U44848	NRF1	factor 1 nuclear respiratorio	3,5	2,4
U73328	DLX4	homeobox distal menos 4	3,2	2,4
HG4593- HT4998		canal de sodio regulado por voltaje (SCN1A)	2,3	2,4
X78710	MTF1	factor metal-regulador 1 de la transcripción	2,7	2,4
X59727	MAPK4	proteína quinasa activada por mitógeno 4	2,3	2,4
J03600	ALOX5	araquidonato 5-lipoxigenasa	2,2	2,3
U87269	E4F1	factor de transcripción E4F-1	3,4	2,3
Y10375	PTPNS1	tirosina fosfatasa, sustrato 1 no receptor	4,5	2,2
D49958	GPM6A	glicoproteína M6A	3,3	2,2
U60062	FEZ1	proteína zeta 1 de fasciculación y elongación (zingina I)	3,3	2,2
X14830	CHRNA1	receptor colinérgico, nicotínico, polipéptido 1 beta	2,4	2,1
J04076	EGR2	respuesta de crecimiento temprano 2 (Krox-20 homólogo)	3,0	2,1
HG2981- HT3127	CD44	antígeno CD4	2,2	2,1
U49187	C6ORF32	marco de lectura abierto 32 del cromosoma 6	3,8	2,1
X77744		Homo sapiens para la proteína FLJ00032, parcial	2,3	2,1
X68285	GK	glicerol quinasa	2,4	2,0
HG3925- HT4195	SFTPA2	proteína A2 asociada a los pulmones, tensioactiva	3,9	2,0
M26062	IL2RB	receptor de interleuquina 2, beta	0,2	0,5
X06182	KIT	oncogen homólogo V-kit	0,4	0,5

ES 2 385 484 T3

ID Genbank	Nombre del Gen	Comentario de Unigene	Veces 10 ng	Veces 40 ng
U79251	OPCML	proteína de unión a opioides/tipo molécula de adherencia celular	0,5	0,5
J03764	SERPINE1	nexina, inhibidor de tipo 1 del activador de plasminógeno	0,5	0,5
X9281A	HREV107	similar a HREV107 de rata	0,3	0,5
L01087	PRKCQ	proteína quinasa C, theta	0,2	0,5
D43772	GRB7	proteína 7 de unión al receptor del factor de crecimiento	0,2	0,5
X15880	COL6A1	colágeno, tipo VI, alfa 1	0,5	0,5
HG3115-HT3291	MBP	proteína básica de mielina	0,4	0,5
X83301	SMA3	SMA3	0,5	0,5
D87469	CELSR2	cadherina, receptor 2 de tipo G EGF LAG de siete pasos	0,4	0,5
M11313	A2M	alfa-2-macroglobulina	0,4	0,4
X64877	HFL3	factor H (complemento) tipo 3	0,4	0,4
Z18859	GNAT2	proteína de unión al nucleótido de guanidina (proteína G)	0,4	0,4
D89077	SLA	adaptador de tipo Src	0,4	0,4
L25444	TAF2E	factor asociado a la proteína de unión a la caja TATA (TBF)	0,2	0,4
M26665	HTN3	histatina 3	0,4	0,4
S69790	WASF3	familia de proteína WAS, miembro 3	0,4	0,4
U79248		secuencia del clon 23826 humano	0,4	0,4
L15309	ZNF141	proteína con dedos de cinc 141 (clon pHZ-44)	0,3	0,4
L41147	HTR6	receptor 6 de 5-hidroxitriptamina (serotonina)	0,4	0,4
X58431	HOXB6	homeobox B6	0,4	0,4
U50360	CAMK2G	quinasa II gamma CaM	0,2	0,4
D88152	ACATN	transportador de acetil-Coenzima A	0,4	0,4
U38480	RXRG	receptor X retinoide, gamma	0,3	0,4
X16866	CYP2D7AP	citocromo P450, subfamilia IID	0,4	0,4
X70991	NAB2	proteína de unión 2 a NGFI-A (ERG1 pb 2)	0,2	0,4
M60830	EVI2B	sitio 2B de integración viral ecotrópica	0,4	0,4
M27492	IL1R1	receptor de interleuquina 1, tipo I	0,4	0,4
Z35093	SURF1	surfeit 1	0,4	0,4
D86425	NID2	nidógeno 2	0,3	0,3
U59914	MADH6	MAD) homólogo 6	0,4	0,3
M18255	PRKCB1	proteína quinasa C, beta 1	0,4	0,3
AF000234	P2RX4	receptor porinérgico P2X	0,3	0,3
S77763	NFE2	factor nuclear (derivado eritroide 2), 45kD	0,4	0,3
U78722	ZNF165	proteína con dedos de cinc 165	0,3	0,3
L05568	SLC6A4	familia 6 del portador de soluto (serotonina),	0,3	0,3
L31529	SNTB1	proteína A1 asociada a sintropina, distrofina,	0,3	0,3
U47054	ART3	ADP-ribosiltransferasa3	0,4	0,3

ID Genbank	Nombre del Gen	Comentario de Unigene	Veces 10 ng	Veces 40 ng
M13955	KRT7	queratina 7	0,4	0,3
D15049	PTPRH	proteína tirosina fosfatasa, tipo de receptor, H	0,4	0,3
U03486	GJA5	proteína de uniones en hendidura, alfa 5, 40kD (conexina 40)	0,5	0,3
X06256	ITGA5	integrina, alfa 5	0,4	0,3
U22314	REST	factor de transcripción silenciador de RE1	0,3	0,3
U51096	CDX2	factor de transcripción de tipo homeobox 2	0,2	0,2
D31762	KLAA0057	proteína de tipo TRAM	0,4	0,2
M23668	FDX1	ferredoxina 1	0,2	0,2
U53476	WNT7A	familia del sitio de integración de MMTV de tipo sin alas	0,2	0,2
X57206	ITPKB	inositol 1,4,5-trisfosfato 3-quinasa B	0,2	0,2
Z31695	INPP5A	inositol polifosfato-5-fosfatasa, 40kD	0,4	0,2
S66793	ARR3	arrestina 3, retinal (X-arrestina)	0,2	0,2
U59877	RAB31	RAB31, miembro de la familia de oncogenes RAS	0,2	0,2
U53786	EVPL	envoplaquina	0,2	0,2
S83362	LIFR	receptor del factor inhibidor de leucemia	0,3	0,2
D42038	KIAA0087	producto génico KIAA0087	0,3	0,2
HG4333-HT4603	ZNF79	proteína con dedos de cinc 79 (pT7)	0,1	0,1
L01406	GHRHR	receptor de la hormona liberadora de la hormona de crecimiento	0,4	0,1

Ejemplo 3.23: Respuesta de Leucocitos Humanos a IL18.

5 Se sometió a ensayo la respuesta de los leucocitos humanos (leucofóresis aislada) para responder a IL18 sola o combinada con IL12. También se sometió a ensayo la capacidad de un anticuerpo monoclonal anti-IL18 para inhibir la respuesta transcripcional. Las células se trataron como se describe en el Ejemplo 4.1. El ARN se aisló y se utilizó para sondear Genechips Affymetrix (Hugene, FL). Los resultados se muestran en la Tabla 23, que enumera 49 transcritos inducidos por IL18 + IL12 y revertidos por anticuerpo anti-IL18. Varios genes fueron relevantes para el sistema inmunitario. Muchos de estos genes también fueron inducidos por IL18 en células KG-1.

10

Tabla 23.

Otros marcadores potenciales de IL18/IL12 seleccionaron transcritos regulados al alza cuatro veces o más por IL18+IL12 y revertidos por 1252H en una muestra de leucocitos humanos según se determinó utilizando Genechips Affymetrix.

Nombre del Gen	Comentario de Unigene	Unigene
KIAA0001	receptor acoplado a proteína G putativo para UDP-glucosa	Hs.2465
LIMK2	dominio quinasa 2 LIM	Hs.278027
KIAA0196	producto génico KIAA0196	Hs.8294
IFNG	interferón, gamma	Hs.856
POLR2C	polipéptido de polimerasa (ARN) II	Hs.79402
DAG1	distroglicano 1	Hs.76111
TPSB1	triptasa beta 1	Hs.250700
CDR2	proteína relacionada con la degeneración cerebelar (62kD)	Hs.75124
TCF12	factor de transcripción 4 con motivo hélice-asa-hélice	Hs.21704

ES 2 385 484 T3

Nombre del Gen	Comentario de Unigene	Unigene
TACTILE	activación células T, aumento de la expresión tardía	Hs.142023
PIP5K2A	fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa	Hs.108966
SF3A3	factor de empalme 3a, subunidad 3, 60kD	Hs.77897
SEL1L	sel-1 de tipo (supresor de lin-12, C.elegans)	Hs.181300
IL15	interleuquina 15	Hs.168132
BAK1	antagonista de BCL2/asesino 1	Hs.93213
SLAM	molécula de activación linfocítica de la señalización	Hs.32970
SCYB11	subfamilia B de citoquina inducible pequeña (Cys-X-Cys), miembro 11	Hs.103982
LIMK1	dominio quinasa 1 LIM	Hs.36566
CAT56	proteína CAT56	Hs.118354
POLRMT	polimerasa (ARN) mitocondrial (dirigida a ADN)	Hs.153880
SCYA4	citoquina A4 inducible pequeña/Mip-1b	Hs.75703
MIG	monoquina inducida por interferón gamma	Hs.77367
SSX3	sarcoma sinovial, X punto de rotura 3	Hs.178749
TNFRSF6	superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 6	Hs.82359
MAT1A	metionina adenosiltransferasa I, alfa	Hs.323715
KIAA0133	producto génico KIAA0133	Hs.57730
FCGBP	fragmento Fc de la proteína de unión a IgG	Hs.111732
ARHD	familia genes homólogos ras, miembro	Hs.15114
FGFR2	receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos	Hs.278581
COL9A1	colágeno, tipo IX, alfa 1	Hs.154850
HPX42B	homeobox progenitor hematopoyético	Hs.125231
TAL2	leucemia linfoctica aguda 2 de células T	Hs.247978
	ESTs	Hs.196244
REN	renina	Hs.3210
POU2F2	dominio POU, clase 2, factor de transcripción 2	Hs.1101
ALOX12	araquidonato 12-lipoxigenasa	Hs.1200
ACTN2	actinina alfa 2	Hs.83672
KLK2	calicreína 2, prostática	Hs.181350
RCV1	recoverina	Hs.80539
E2F4	factor de transcripción E2F-4, unión a p107/p130	Hs.108371
SEMA3F	dominio (Ig) de inmunoglobulina, dominio básico corto, secretado, (semaforina) 3F	Hs.32981
BHMT	metiltransferasa de betaina-homocisteína	Hs.80756
IEVPL	envoplaquina	Hs.25482
BBC3	componente 3 de unión a Bcl-2	Hs.87246
SLN	sarcolipina	Hs.15219
RDBP	proteína de unión a ARN RD	Hs.106061
MT1H	metalotioneína 1H	Hs.2667
RAD54L	RAD54 de tipo (S.cerevisiae)	Hs.66718

Nombre del Gen	Comentario de Unigene	Unigene
MLL3	leucemia 3 de linaje mieloide/linfocitoide o mixto	Hs.288971

Ejemplo 3.2.4: Respuesta de sangre humana completa a IL18.

Se sometió a ensayo la respuesta de sangre humana completa a IL18 sola o combinada con IL12. También se sometió a ensayo la capacidad de un anticuerpo monoclonal anti-IL18 para inhibir la respuesta transcripcional. Se trataron muestras de sangre de donantes normales como se describe en el Ejemplo 4.1. Se aisló el ARN y se utilizó para sondear los Genechips Affymetrix (HugeneFL). Los resultados se muestran en la Tabla 24 que enumera 16 transcritos que fueron regulados significativamente por IL18 + IL12 y revertidos por anticuerpo anti-IL18 en muestras de sangre completa aisladas de dos donantes sanos. Varios genes fueron relevantes para el sistema inmunitario. Los autores de la presente invención continuaron para someter a ensayo la respuesta de tres de estos genes en el panel de 10 donantes normales utilizando la PCR cuantitativa. Los resultados de este estudio de variabilidad humana se muestran en la Tabla 25, para el interferón gamma; en la Tabla 26, para CXCL9 y en la Tabla 27, para CCL8. Los resultados del estudio de variabilidad indicaron que es probable que la regulación de estos transcritos por IL18 en sangre humana sea común entre los seres humanos.

Tabla 24. Otros marcadores potenciales de IL18/IL12 seleccionados a partir de transcritos regulados al alza en sangre completa aislados de dos donantes se trataron a continuación con IL18+IL12.

ID del Grupo de Sondas	Título	Unigene
202284_s_at	inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1A(p21, Cip1)	His.179665
202531_at	factor 1 regulador de interferón	Hs.80645
2040578_at	proteína de unión 1 a la secuencia consenso del interferón	Hs.14453
205488_at	granzima A (granzima 1, serina esterasa 3 asociada a linfocitos T citotóxicos)	Hs.90708
206554_x_at	dominio SET y gen de fusión de la transposasa mariner	Hs.265855
206817_x_at	4 que contiene repeticiones de trinucleótidos	Hs.26047
207509_s_at	receptor 2 de tipo Ig asociado a leucocitos	Hs.43803
209546_s_at	apolipoproteína L, 1	Hs.114309
214438_at	homeobox 1 de tipo H2.0 (Drosophila)	Hs.74870
214450_at	catepsina W (linfopapaína)	Hs.87450
216950_s_at	forma b de FcRI (AA 1-344) [Homo sapiens], secuencia de ARNm	Hs.382006
217933_s_at	leucina aminopeptidasa 3	Hs.182579
219386_s_at	activador de linfocitos B expresado por macrófagos	Hs.20450
219956_at	UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina:polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 6	Hs.151678
219971_at	receptor de interleuquina 21	Hs.210546
221223_x_at	proteína que contiene SH2 inducible por citoquina	Hs.8257

Tabla 25. Funcionamiento de Interferón y en diez muestras de sangre humana . $p < 0,05$ para la inhibición por cualquier anticuerpo

IFN	No estimulado	Estimulado	2.5 Anti-IL18	125-2H Anti-IL18
donante 3n	0,001	0,187	0,014	0,026
donante 5n	0,003	0,012	0,006	0,006
donante 9n	0,001	1,250	0,037	0,000
donante 10n	0,002	0,361	0,024	0,002
donante 1n	0,002	0,339	0,022	0,070
donante 2n	0,001	0,032	0,003	0,003
donante 4n	0,001	0,082	0,011	0,027

IFN	No estimulado	Estimulado	2.5 Anti-IL18	125-2H Anti-IL18
donante 6n	0,002	0,076	0,006	0,010
donante 7n	0,002	0,049	0,009	0,012
donante 8n	0,002	0,049	0,009	0,012

Tabla 26. Funcionamiento de MIG/CXCL9 en diez muestras de sangre humana. $p < 0.05$ para la inhibición por cualquier anticuerpo.

CXCL9	No estimulado	Estimulado	2.5 Anti-IL18	125-2H Anti-IL18
donante 1	0,000	0,170	0,082	0,010
donante 10	0,000	0,015	0,000	0,000
donante 2	0,001	0,006	0,001	0,001
donante 3	0,000	0,067	0,010	0,006
donante 4	0,000	0,023	0,012	0,003
donante 5	0,000	0,004	0,000	0,000
donante 6	0,000	0,070	0,001	0,001
donante 7	0,001	0,034	0,001	0,000
donante 8	0,001	0,034	0,001	0,000
donante 9	0,000	0,035	0,000	0,001

5 **Tabla 27. Funcionamiento de MCP2/CCL8 en diez muestras de sangre humana. $p < 0.05$ para la inhibición por cualquier anticuerpo.**

CCL8	No estimulado	Estimulado	2.5 Anti-IL18	125-2H Anti-IL18
donante 1	0,036	8,941	4,054	1,051
donante 10	0,004	0,987	0,009	0,025
donante 2	0,036	1,225	0,105	0,057
donante 3	0,012	3,923	0,648	0,663
donante 4	0,021	2,227	0,994	0,630
donante 5	0,001	0,005	0,001	0,001
donante 6	0,000	0,023	0,002	0,001
donante 7	0,001	0,009	0,001	0,001
donante 8	0,001	0,009	0,001	0,001
donante 9	0,001	2,438	0,003	0,059

Ejemplo 4: Caracterización de HuMab anti-IL-18 2.13(E)mg1

10 **Ejemplo 4.1: Especificidad de Citoquinas Humanas**

La especificidad de 2.13(E)mg1 para la IL-18 humana se evaluó utilizando el análisis BIACORE siguiendo las instrucciones del fabricante (véase el Ejemplo 2.1.B). Se capturó 2.13(E)mg1 sobre un chip biosensor y se determinó su capacidad para unirse a un panel de citoquinas humanas conocidas en solución. Como se muestra en la Tabla 28, 2.13(E)mg1 se unió a la IL-18 humana madura recombinante. Sin embargo, 2.13(E)mg1 no se unió a proIL-18 humana ni se unió a ninguna de las otras 23 citoquinas humanas, incluyendo los miembros de la familia de IL-1 IL-1 α e IL-1 β .

15

Tabla 28 Análisis Biacore de Unión de Citoquinas a 2.13(E)mg1 y 2.5(E)mg1

Citoquinas humanas rec. soluble, (1µM)	2.13(E)mg1 Capturado (25 mg/mL)	2.5(E)mg1 Capturado (25 mg/mL)
	Unión a 2.13(E)mg1	Unión a 2.5(E)MG1g
IFN γ	-	-
IL-1 α	-	-
IL-1 β	-	-
Otras citoquinas ^a	-	-
IL-18 ^b	+	+
Pro-IL-18	-	+

^c Las citoquinas adicionales sometidas a ensayo para determinar su unión incluyeron IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-21, TNF, LT, LT α 1 β 2, y LT α 2 β 1. 2.13(E)mg1 no se une a ninguna de estas citoquinas.
Mutante BV Cisteína > Alanina derivado de IL-18 humana recombinante

Ejemplo 4.2: Competición con otros anticuerpos para unirse a IL-18 humana

5 Se evaluó la capacidad de varios anticuerpos anti-IL-18 para competir con 2.13(E)mg1 por la unión a IL-18 humana utilizando el análisis BIACORE siguiendo las instrucciones del fabricante (véase el Ejemplo 2.1.B). En resumen, se capturaron anticuerpos policlonales anti-humano o anti-ratón sobre un chip biosensor. Después de eso, se introdujeron los anticuerpos anti-IL-18 y fueron capturados por los anticuerpos policlonales anti-humano o anti-ratón (solamente para 125-2H) inmovilizados sobre el chip biosensor descrito más arriba (anticuerpo inmovilizado primario). Luego, se introdujo la IL-18 humana recombinante y fue capturada por el anticuerpo inmovilizado primario. Finalmente, se introdujeron anticuerpos secundarios anti-IL-18 soluble. El análisis midió la capacidad del anticuerpo secundario anti-IL-18 soluble para unirse a la IL-18 recombinante y competir con el anticuerpo primario. 2.13(E)mg1 no competía ni con 2.5(E)mg1 ni con IL-18BP. El anticuerpo monoclonal anti-huIL-18 murino 125-2H competía con 15 2.13(E)mg1 por la unión a IL-18 humana.

Tabla 29 Análisis BIACORE de Competición del Anticuerpo para unirse a IL-18 humana

2 ^o Ab soluble	1 ^{er} Ab Inmovilizado								
	125-2H	2.5(E)mg1	215	444	581	435	2.13(E)mg1	2.3	IL-18BP
125-2H	-	+	-	-	+	+	-	-	+
2.5(E)mg1	+	-	+	+	-	-	+	+	+
215	-	+	-	-	+	+	-	-	+
444	-	+	-	-	+	+	-	-	+
581	+	-	+	+	-	-	+	+	+
435	+	-	+	+	-	-	+	+	+
2.13(E)mg1	-	+	-	-	+	+	-	-	+
2.3	-	+	-	-	+	+	-	-	+
IL-18BP	+	+	+	+	+	+	+	+	-

+ indica que los anticuerpos primario y secundario se unen simultáneamente
- indica que el anticuerpo secundario no se une a la IL-18 capturada

20 La presente invención incorpora como referencia en su totalidad técnicas bien conocidas en el campo de la biología molecular. Estas técnicas incluyen, pero no están limitadas a, las técnicas descritas en las siguientes publicaciones:

Ausubel, F.M. et al. eds., Short Protocols In Molecular Biology (4^a Ed. 1999) John Wiley & Sons, NY. (ISBN 0-471-32938-X).

25 Lu y Weiner eds., Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysis (2001) BioTechniques Press. Westborough, MA. pág. 298 (ISBN 1-881299-21-X).

Kontermann y Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York página 790. (ISBN 3-540-41354-5).
 Old, R.W. & S.B. Primrose, Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering (3ª Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V.2: página 409. (ISBN 0-632-0.1318-4).
 5 Sambrook, J. et al. eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6).
 Winnacker, E.L. From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology (1987) VCH Publishers, NY (traducido por Horst Ibelgauffs). página 634. (ISBN 0-89573-614-4).

10 **Referencias**

Patentes de los Estados Unidos

5.545.806	5.545.807	5.591.669	5.612.205	5.625.126	5.625.825	5.627.052
5.633.425	5.643.763	5.661.016	5.721.367	5.770.429	5.789.215	5.789.650
5.814.318	5.912.324	5.916.771	5.939.598	5.985.615	5.994.619	5.998.209
6.054.487	6.060.283	6.075.181	6.091.001	6.114.598	6.130.364	

15 Publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos 20030186374
 Solicitud de los Estados Unidos Núm. de Serie 09/428.082

Documentos de Patentes Extranjeras

EP 712 931	EP 850 952	EP 864 585	EP 0 962 531	EP 0 974 600	JP 111,399194
IL 121554 A0	WO 91/10741	WO 91/17271	WO 92/01047	WO 92/02551	WO 92/09690
WO 92/15679	WO 92/18619	WO 92/20791	WO 93/01288	WO 94/02602	WO 96/33735
WO 96/34096	WO 97/24441	WO 97/29131	WO 98/16654	WO 98/24893	WO 98/41232
WO 98/50433	WO 99/09063	WO 99/22760	WO 99/25044	WO 99/37772	WO 99/37773
WO 99/45031	WO 99/53049	WO 00/37504	WO 00/09560	WO 00/12555	WO 00/37504
WO 00/56772	WO 01/58956	WO 01/83525	WO 02/72636		

20

Otras Referencias

Adachi O., et al. (1998) Immunity 9:143-150
 Akita, K. et al., (1997) J. Biol. Chem. 272, 26595-26603
 25 Azzazy H., y Highsmith W.E., (2002) Clin. Biochem. 35:425-445
 Babcock, J.S. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848
 Barbas et al. (1991) PNAS 88:7978-7982
 Bendele, A., et al (1999) Toxicol Pathol. 27:134-142
 Bird et al. (1988) Science 242:423-4.26
 30 Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628
 Dinarello, C. et al. (1998) J. Leukoc. Biol. 63:658-654
 Dinarello, C.A. (1999) Methods 19:121-132
 Dinarello, C.A. (1999) J. Allergy Clin. Immunol. 103:11-24;
 Durocher et al., Nucleic Acids Research 2002, Vol 30, No.2
 35 Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372
 Garrad et al. (1991) BiolTechnology 9:1373-1377
 Gaviolondo J.V., y Larrick J.W. (2002) BioTechniques 29:128-145
 Giege, R. y Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2ª ed., págs. 201-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999).
 40 Ghayur, T. et al., (1997) Nature 386:619-623
 Ghetie, V., et al (1997) Nat. Biotechnol. 15:637-640
 Gracie J. A., et al., (2003) Journal of Leukocyte Biology 73, 213-224
 Gram et al. (1992) PNAS 89:3576-3580
 Green et al. Nature Genetics 7:13-21 (1994)
 45 Green y Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495 (1998)
 Griffiths et al. (1993) EMBO J 12:725-734

- Gu, Y. et al., (1997) *Science* 275:206-209
- Hay et al. (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85
- Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990.
- Hawkins et al. (1992) *J Mol Biol* 226:889-896
- 5 Hezareh, M., et. al., (2001) *J. Virology*,75 (24):12161-12168
- Holliger, P., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448
- Hoogenboom et al. (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137
- Hoogenboom H.R., (1997) *TIB Tech.* 15:62-70
- Hoogenboom H., y Chames P. (2000) *Immunology Today* 21:371-378
- 10 Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883
- Hoshino K., et al (1999) *J. Immunol.* 162:5041-5044
- Huse et al. (1989) *Science* 246:1275-1281
- Johnsson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.
- Johnsson, B., et al. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131
- 15 Jönsson, U., et al. (1991) *Biotechniques* 11:620-627
- Jönsson, U., et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26
- Kanakaraj P., (1999) *J. Exp. Med.* 189:1129-1138
- Kaufman, R.J. y Sharp, P.A., (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621
- Kearney et al. *J. Immunol.* 123, 1979, 1548-1550
- 20 Kellermann S. A. y Green L.L. (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13:593-597
- Kim J.K., et al (1999) *Eur. J. Immunol.* 29:2819-2825
- Konishi, K., et al (1997) *J. Immunol. Métodos* 209:187-191
- Kipriyanov, S.M., et al. (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058
- Kipriyanov, S.M., et al. (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101
- 25 Leung, B.P., et al (2001) *J. Immunol.* 167:2879-2886
- Little M. et al (2000) *Immunology Today* 21:364-370 BioTechniques Press. Westborough, MA. pág. 98. (ISBN 1-881299-21-X).
- Lund, J. et al., *J. Immunology* (1991) 147: 2657-2662
- McCafferty et al., *Nature* (1990) 348:552-554
- 30 McInnes, I.B. et. al. (2000) *Immunology Today* 21:312-315;
- Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997)
- Mizushima, S. y Nagata, S., (1990) *Nucleic acids Research* Vol 18, No. 17
- Nakanishi, K. et al (2001) *Ann. Rev. Immunol* 19:423-474.
- Nakanishi K., et al (2001) *Cytokine and Growth Factor Rev.* 12:53-72
- 35 Neeta, M.G., et al (2000) *J. Immunol.* 164:2644-2649
- Ober, R.J., et al (2001) *Int. Immunol.* 13:1551-1559
- Poljak, R.J., et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123
- Seidman, J.G., Smith, J.A., y K. Struhl eds; Wiley Interscience, N.Y., N.Y. (1990)
- Sims, J.E., (2002) *Current Opin Immunol.* 14:117-122
- 40 Sugawara, S. et al., (2001) *J. Immunol.*, 167, 6568-6575
- Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.
- Takeda, K., et al. (1998) *Immunity* 8:383-390
- Taylor, L. D., et al. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295
- Tissi L., et al (1999) *Infect. Immunol.* 67:4545-50
- 45 Trentham, D.E. et al (1977) *J. Exp. Med.* 146:857-868
- Tsutsui, H. et al., (1999) *Immunity* 11:359-67
- Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220
- Ushio, S., et al. (1996) *J. Immunol.* 156:4274-4279
- Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546
- 50 Wei, X.Q., et al (2000) *J. Immunol.* 166:517-521
- Winnacker, E.L. *From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology* (1987) VCH Publishers, NY (traducido por Horst Ibelgauffs). pág. 634. (ISBN 0-89573-614-4).

55 Aunque se han descrito más arriba numerosas realizaciones y características, los expertos en la técnica comprenderán que se pueden realizar modificaciones y variaciones de las realizaciones y características descritas sin apartarse de la invención definida en las reivindicaciones adjuntas.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Ghayur, Tariq
 Labkovsky, Boris
 voss, Jeffrey Green, Larry

10 Babcook, John
 Jia, xiao-chi
 Wieler, James
 Kang, Paul
 Hegberg, Brad
 <120> Proteínas de Unión a IL-18
 <130> BBC-085US

15 <140> no asignada todavía
 <141> presentada adjunta simultáneamente
 <160> 47
 <210> 1

20 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala Met
 1 5 10 15

Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Ala Glu Asp Asp Glu Asn
 20 25 30

Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile
 35 40 45

Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro
 50 55 60

Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg
 65 70 75 80

Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met
 85 90 95

Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys
 100 105 110

Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile
 115 120 125

Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly
 130 135 140

His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe
 145 150 155 160

Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys
 165 170 175

Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu
 180 185 190

25 Asp

ES 2 385 484 T3

<210> 2
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

5

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val₁₆₅ Glu Val His Asn Ala₁₇₀ Lys Thr Lys Pro Arg Glu₁₇₅
 Glu Gln Tyr Asn₁₈₀ Ser Thr Tyr Arg Val₁₈₅ Val ser Val Leu Thr Val Leu
 His Gln Asp₁₉₅ Trp Leu Asn Gly Lys₂₀₀ Glu Tyr Lys Cys Lys₂₀₅ Val Ser Asn
 Lys Ala₂₁₀ Leu Pro Ala Pro Ile₂₁₅ Glu Lys Thr Ile Ser₂₂₀ Lys Ala Lys Gly
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln₂₃₀ Val Tyr Thr Leu Pro₂₃₅ Pro Ser Arg Glu Glu₂₄₀
 Met Thr Lys Asn₂₄₅ Gln Val Ser Leu Thr Cys₂₅₀ Leu Val Lys Gly Phe Tyr₂₅₅
 Pro ser Asp Ile₂₆₀ Ala Val Glu Trp Glu₂₆₅ Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 Asn Tyr Lys₂₇₅ Thr Thr Pro Pro Val₂₈₀ Leu Asp Ser Asp Gly₂₈₅ Ser Phe Phe
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val₂₉₅ Asp Lys Ser Arg Trp₃₀₀ Gln Gln Gly Asn
 Val Phe Ser Cys Ser Val₃₁₀ Met His Glu Ala Leu₃₁₅ His Asn His Tyr Thr₃₂₀
 Gln Lys Ser Leu Ser₃₂₅ Leu Ser Pro Gly Lys₃₃₀

<210> 3
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

5

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 4

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 4

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 5

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 6

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

10

<400> 6

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

<210> 7

<211> 109

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

<210> 8

<211> 121

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

5

<210> 9
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

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

10

<210> 10
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

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

5

<210> 11
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ile Ile Gly Gly Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Thr Ser Ile 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 Thr Tyr Ile Thr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
 100 105

10

<210> 12
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

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

<210> 13

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

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

<210> 14

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

ES 2 385 484 T3

<400> 14

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

<210> 15

<211> 114

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

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

10 Lys Arg

<210> 16

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Arg
20 25 30

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

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Glu Asp Ser Ser Ala Trp Val Phe Glu His Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17

<211> 109

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser His Ile Leu Ser Arg Asn
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Met Tyr Gly Ile Ser Ile Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Asp Asn Ser Leu
85 90 95

Cys Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg
100 105

10 <210> 18

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

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

<210> 19

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

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

<210> 20

<211> 119

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

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

<210> 21

5

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

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

<210> 22

10

<211> 127

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

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

5

<210> 23
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23

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

10

Arg
 <210> 24
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 385 484 T3

<400> 24

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Arg
20 25 30

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

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Pro Ser
50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Glu Asp Ser Ser Ala Trp Val Phe Glu His Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 25

<211> 109

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ile Leu Ser Arg Asn
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ile Ser Ile Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Asp Asn Ser Leu
85 90 95

Cys Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg
100 105

10 <210> 26

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

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

<210> 27

<211> 109

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

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

10 <210> 28

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Ser Gly
20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Ser Tyr Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly His Ile Ser Tyr Arg Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Cys
85 90 95

Cys Ala Arg Asp Arg Gly Gly Gly Phe Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 29

<211> 109

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Thr Ser Ile Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Arg Leu Gly
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Ser Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Glu Ile Asn Arg
100 105

<210> 30

10 <211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5

<210> 31

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

10

<210> 32

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

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

5 <210> 33
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 33

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

10 Ile Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Val Asn Arg
 100 105

<210> 34
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 34

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

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

- <210> 35
- <211> 109
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 35

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

- <210> 36
- 10 <211> 127
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 36

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

<210> 37

<211> 113

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

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

10 Arg

<210> 38

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 385 484 T3

<400> 38

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

<210> 39

<211> 109

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

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

<210> 40

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 40

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Ser Gly
20 25 30

Asp His Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly His Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

5 <210> 41
<211> 114
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 41

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn
65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95

Arg Ile Glu Phe Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile
100 105 110

10 Lys Arg
<210> 42
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial
15 <220>
<223> Secuencia CDR del anticuerpo anti-IL-18

<220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (1)
 <223> Xaa es Ser, Asn, His, Arg, o Tyr
 5 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (2)
 <223> Xaa es Tyr, Gly, Arg, Ser, o Cys
 <220>
 10 <221> rasgo_misc
 <222> (3)
 <223> Xaa es Trp, Gly, Tyr, Asp, Ser, Val, o Ile
 <220>
 <221> rasgo_misc
 15 <222> (4)
 <223> Xaa es Ile, His, Trp, Tyr, Met, Leu, o Asp
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (5)
 20 <223> Xaa es Gly, Tyr, Ser, Asn, o His
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (6)
 <223> Xaa es Trp, o no está presente
 25 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (7)
 <223> Xaa es Thr, Ser, Gly, o no está presente
 <400> 42
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 30 **1 5**
 <210> 43
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Secuencia CDR del anticuerpo anti-IL-18
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (1)
 40 <223> Xaa es Phe, Tyr, His, Ser, o val
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (2)
 <223> Xaa es Ile, o Phe
 45 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (3)
 <223> Xaa es Tyr, Ser, o Trp
 <220>
 50 <221> rasgo_misc
 <222> (4)
 <223> xaa es Pro, Tyr, o Ser
 <220>
 <221> rasgo_misc
 55 <222> (5)
 <223> xaa es Gly, Ser, Arg, o Asp
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (6)
 60 <223> xaa es Asp, o Gly
 <220>
 <221> rasgo_misc

<222> (7)
 <223> Xaa es Ser, Thr, Gly, o Arg
 <220>
 <221> rasgo_misc
 5 <222> (8)
 <223> Xaa es Glu, Thr, Ile, o Asn
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (9)
 10 <223> Xaa es Thr, Tyr, Asn, Ile, Lys, o His
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (10)
 <223> Xaa es Arg, Tyr, o Ser
 15 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (11)
 <223> Xaa es Tyr, Asn, o Ser
 <220>
 20 <221> rasgo_misc
 <222> (12)
 <223> Xaa es Ser, Pro, Ala, o Val
 <220>
 <221> rasgo_misc
 25 <222> (13)
 <223> Xaa es Pro, Ser, o Asp
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (14)
 30 <223> Xaa es Thr, Leu, o Ser
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (15)
 <223> Xaa es Phe, Lys, o Val
 35 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (16)
 <223> Xaa es Gln, Ser, o Lys
 <220>
 40 <221> rasgo_misc
 <222> (17)
 <223> Xaa es Gly, o no está presente
 <400> 43

Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa
 45 <210> 44
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Secuencia CDR del anticuerpo anti-IL-18
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (1)
 <223> Xaa es Val, Asp, Glu, Ser, o Cys
 55 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (2)
 <223> Xaa es Gly, Arg, Asp, Ser, Lys, Leu, Tyr, o Ala
 <220>
 60 <221> rasgo_misc

<222> (3)
 <223> Xaa es Ser, Gly, Tyr, o Arg
 <220>
 <221> rasgo_misc
 5 <222> (4)
 <223> Xaa es Gly, ser, Tyr, Asn, Thr, o Asp
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (5)
 10 <223> Xaa es Trp, Ser, Ala, Gly, Tyr, o Thr
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (6)
 <223> Xaa es Tyr, Gly, Ser, Phe, Trp, o Asn
 15 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (7)
 <223> Xaa es Pro, ser, Phe, Tyr, Val, Gly, Trp, o Val
 <220>
 20 <221> rasgo_misc
 <222> (8)
 <223> Xaa es Tyr, Phe, Asp, Pro, Met, Ile, o Asn
 <220>
 <221> rasgo_misc
 25 <222> (9)
 <223> Xaa es Thr, Trp, Asp, Leu, Tyr, Glu, Pro, Phe, o Gly
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (10)
 30 <223> Xaa es Phe, Asp, Tyr, His, Val, Tyr, o no está presente
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (11)
 <223> Xaa es Asp, Tyr, Phe, Leu, o no está presente
 35 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (12)
 <223> Xaa es Ile, Asp, Tyr, o no está presente
 <220>
 40 <221> rasgo_misc
 <222> (13)
 <223> Xaa es Tyr, o no está presente
 <220>
 <221> rasgo_misc
 45 <222> (14)
 <223> Xaa es Tyr, o no está presente
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (15)
 50 <223> Xaa es Gly, o no está presente
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (16)
 <223> Xaa es Met, o no está presente
 55 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (17)
 <223> Xaa es Asp, o no está presente
 <220>
 60 <221> rasgo_misc
 <222> (18)
 <223> Xaa es Val, o no está presente

<400> 44

Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa

<210> 45

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia CDR del anticuerpo anti-IL-18

<220>

10 <221> rasgo_misc

<222> (1)

<223> Xaa es Arg, o Lys

<220>

<221> rasgo_misc

15 <222> (2)

<223> Xaa es Ala, Gly, o Eer

<220>

<221> rasgo_misc

<222> (3)

20 <223> Xaa es Ser

<220>

<221> rasgo_misc

<222> (4)

<223> Xaa es Glu, Arg, Gln, o His

25 <220>

<221> rasgo_misc

<222> (5)

<223> Xaa es Ser, Ile, Thr, o Asn

<220>

30 <221> rasgo_misc

<222> (6)

<223> Xaa es Ile, Val, Leu, o Phe

<220>

<221> rasgo_misc

35 <222> (7)

<223> Xaa es Ser, Gly, Leu, Asn, o Arg

<220>

<221> rasgo_misc

<222> (8)

40 <223> Xaa es Ser, Gly, Tyr, Arg, Asn, His, o Asp

<220>

<221> rasgo_misc

<222> (9)

<223> Xaa es Asn, Gly, Tyr, Arg, o Ser

45 <220>

<221> rasgo_misc

<222> (10)

<223> Xaa es Leu, Tyr, Ser, o Asp

<220>

50 <221> rasgo_misc

<222> (11)

<223> Xaa es Ala, Leu, Asn, Val, Gly, o Asp

<220>

<221> rasgo_misc

55 <222> (12)

<223> Xaa es Ala, Asn, Glu, Lys, Gly, o no está presente

<220>

<221> rasgo_misc

<222> (13)

60 <223> Xaa es Lys, Thr, Asn, o no está presente

<220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (14)
 <223> Xaa es Asn, Tyr, Thr, o no está presente
 5 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (15)
 <223> Xaa es Tyr, Leu, o no está presente
 <220>
 10 <221> rasgo_misc
 <222> (16)
 <223> Xaa es Leu, Cys, Tyr, o no está presente
 <220>
 <221> rasgo_misc
 15 <222> (17)
 <223> Xaa es Ala, Asp, o no está presente
 <400> 45

Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa
 <210> 46
 20 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia CDR del anticuerpo anti-IL-18
 25 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (1)
 <223> Xaa es Thr, Gly, Ser, Trp, o Glu
 <220>
 30 <221> rasgo_misc
 <222> (2)
 <223> Xaa es Ala, Val, Thr, Ile, o Leu
 <220>
 <221> rasgo_misc
 35 <222> (3)
 <223> Xaa es Ser, o Phe
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (4)
 40 <223> Xaa es Thr, Ile, Asn, Ser, Arg, o Tyr
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (5)
 <223> Xaa es Arg, o Leu
 45 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (6)
 <223> Xaa es Ala, Gln, Glu, o Phe
 <220>
 50 <221> rasgo_misc
 <222> (7)
 <223> Xaa es Thr, o Ser
 <400> 46

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5
 55 <210> 47
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia CDR del anticuerpo anti-IL-18
 <220>
 <221> rasgo_misc
 5 <222> (1)
 <223> Xaa es Gln, o Met
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (2)
 10 <223> Xaa es Gln, His, o Tyr
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (3)
 <223> Xaa es Tyr, Asn, Gly, Ser, o Arg
 15 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (4)
 <223> Xaa es Asn, His, Tyr, Asp, Gly, Val, Leu, o Ile
 <220>
 20 <221> rasgo_misc
 <222> (5)
 <223> Xaa es Asn, Gly, Ile, Tyr, Ser, Gln, Phe, o Glu
 <220>
 <221> rasgo_misc
 25 <222> (6)
 <223> Xaa es Trp, Ser, Thr, Leu, Ile, o Phe
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (7)
 30 <223> Xaa es Pro, Leu, Thr, Asp, o Ile
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (8)
 <223> Xaa es Ser, Leu, Pro, cys, Trp, Ile, o Phe
 35 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (9)
 <223> Xaa es Ile, Thr, Ser, o no está presente
 <220>
 40 <221> rasgo_misc
 <222> (10)
 <223> Xaa es Thr, o no está presente
 <400> 47
 Xaa
 1 5 10
 45
 50
 Xaa
 1 5 10
 55

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, capaz de unirse IL-18 humana, donde dicho anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, comprende una CDR-H1 que tiene los Residuos 31-35 del SEQ ID NO: 6; una CDR-H2 que tiene los Residuos 50-66 del SEQ ID NO: 6; una CDR-H3 que tiene los Residuos 99-110 del SEQ ID NO: 6; una CDR-L1 que tiene los Residuos 24-34 del SEQ ID NO: 7; una CDR-L2 que tiene los Residuos 50-56 del SEQ ID NO: 7; y una CDR-L3 que tiene los Residuos 89-98 del SEQ ID NO: 7.
- 10 2. El anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, comprende un V_H .
3. El anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho V_H comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 6.
- 15 4. El anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, comprende un V_L .
- 20 5. El anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 4, donde dicho V_L comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 7.
6. El anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, comprende un V_H y un V_L .
- 25 7. El anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 6, donde dicho V_L comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 7, y dicho V_H comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 6.
- 30 8. El anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un dominio constante de una cadena pesada de inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en: un dominio constante de IgM humana; un dominio constante de IgG1 humana; un dominio constante de IgG2 humana; un dominio constante de IgG3 humana; un dominio constante de IgG4 humana; un dominio constante de IgE humana y un dominio constante de IgA humana.
- 35 9. El anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho dominio de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina es un dominio constante de IgG1 humana.
- 40 10. El anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 9, donde dicho dominio constante de IgG1 humana comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.
- 45 11. El anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende adicionalmente un dominio constante de una cadena ligera de inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en: un dominio constante kappa de Ig humana y un dominio constante lambda de Ig humana.
- 50 12. El anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 11, donde dicho dominio de la región constante de la cadena ligera de inmunoglobulina es un dominio constante kappa de Ig humana que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 4.
13. El anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 11, donde dicho dominio de la región constante de la cadena ligera de inmunoglobulina es un dominio constante lambda de Ig humana que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 5.
- 55 14. El anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, se selecciona del grupo que consiste en una molécula de inmunoglobulina; un scFv; un anticuerpo monoclonal; un anticuerpo humano; un anticuerpo quimérico; un anticuerpo humanizado; un fragmento Fab; un fragmento Fab'; un F(ab')₂; un Fv; y un Fv conectado por disulfuro.
- 60 15. El anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 14, donde dicho anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, es un anticuerpo humano.
16. El anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1 donde dicho anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, es capaz de neutralizar IL-18 humana.

17. El anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 16, donde dicha IL-18 humana se selecciona del grupo que consiste en pro-IL-18 humana; IL-18 madura humana y IL-18 truncada humana.
- 5 18. El anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 16, donde dicho anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, disminuye la capacidad de IL-18 humana para unirse a su receptor.
- 10 19. El anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 18, donde dicho anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, disminuye la capacidad de pro-IL-18 humana, IL-18 madura humana, o IL-18 truncada humana para unirse a su receptor.
- 15 20. El anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 16, donde dicho anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo es capaz de reducir una o más actividades biológicas de IL-18 humana seleccionadas del grupo que consiste en modulación de Th1; modulación de Th2; modulación de Nk; modulación de neutrófilos; modulación del linaje de monocitos-macrófagos; modulación de neutrófilos; modulación de eosinófilos; modulación de células B; modulación de citoquinas; modulación de quimioquinas; modulación de moléculas de adherencia; y modulación del reclutamiento celular.
- 20 21. El anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 16, donde dicho anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, tiene una constante de disociación (K_D) seleccionada del grupo que consiste en: a lo sumo 10^{-7} M; a lo sumo 10^{-8} M; a lo sumo 10^{-9} M; a lo sumo 10^{-10} M; a lo sumo 10^{-11} M; a lo sumo 10^{-12} M; y a lo sumo 10^{-13} M.
- 25 22. El anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 16, donde dicho anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, tiene una velocidad de unión seleccionada del grupo que consiste en: al menos $10^2 M^{-1} s^{-1}$, al menos $10^3 M^{-1} s^{-1}$, al menos $10^4 M^{-1} s^{-1}$, al menos $10^5 M^{-1} s^{-1}$ y al menos $10^6 M^{-1} s^{-1}$.
- 30 23. El anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 16, donde dicho anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, tiene una velocidad de desunión seleccionada el grupo que consiste en: a lo sumo $10^{-3} s^{-1}$; a lo sumo $10^{-4} s^{-1}$; a lo sumo $10^{-5} s^{-1}$; y a lo sumo $10^{-6} s^{-1}$.
- 35 24. Un anticuerpo marcado, o porción de unión al antígeno del mismo, que comprende un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-23, donde dicho anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, se conjuga con una marca detectable.
- 40 25. El anticuerpo marcado, o porción de unión al antígeno del mismo, de la reivindicación 24, donde la marca detectable se selecciona del grupo que consiste en: una radiomarca, una enzima, una marca fluorescente, una marca luminiscente, una marca bioluminiscente, una marca magnética, y biotina.
- 45 26. El anticuerpo marcado, o porción de unión al antígeno del mismo, de la reivindicación 25, donde dicha marca es una radiomarca seleccionada del grupo que consiste en: H^3 , C^{14} , S^{35} , Y^{90} , Tc^{99} , In^{111} , I^{125} , I^{131} , Lu^{177} , Ho^{166} , o Sm^{153} .
- 50 27. Un anticuerpo conjugado, o porción de unión al antígeno del mismo, que comprende un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-23, donde dicho anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, se conjuga con un agente terapéutico o citotóxico.
- 55 28. El anticuerpo conjugado, o porción de unión al antígeno del mismo, de la reivindicación 27, donde dicho agente terapéutico o citotóxico se selecciona del grupo que consiste en: un antimetabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citoquina, un agente anti-angiogénico, un agente anti-mitótico, una antraciclina, una toxina, y un agente apoptótico
- 60 29. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23.
30. Un vector que comprende un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 29.
31. El vector de acuerdo con la reivindicación 30, donde dicho vector se selecciona del grupo que consiste en: pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, y pBJ,
32. Una célula anfitriona que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 30 o 31.
33. La célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 32, donde dicha célula anfitriona es una célula procariótica.

34. La célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 33, donde dicha célula anfitriona es E.Coli.
35. La célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 32, donde dicha célula anfitriona es una célula eucariótica.
- 5 36. La célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 35, donde dicha célula eucariótica se selecciona del grupo que consiste en: una célula protista, una célula animal, una célula vegetal y una célula fúngica.
37. La célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 36, donde dicha célula eucariótica es una célula animal seleccionada del grupo que consiste en: una célula de mamífero, una célula de ave, y una célula de insecto.
- 10 38. La célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 37, donde dicha célula animal es una célula CHO.
39. La célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 37, donde dicha célula anfitriona es una célula COS.
- 15 40. La célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 36, donde dicha célula eucariótica es *Saccharomyces cerevisiae*.
41. La célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 37, donde dicha célula animal es una célula Sf9 de insecto.
- 20 42. Un método para la producción de un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, que se une a IL-18 humana, comprendiendo el método la etapa de cultivar la célula anfitriona de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 32-41 en un medio de cultivo en condiciones suficientes para producir un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, que se une a IL-18 humana.
- 25 43. Un anticuerpo cristalizado, o porción de unión al antígeno del mismo, que comprende un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-23, donde dicho anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, existe en forma de cristal.
- 30 44. El anticuerpo cristalizado, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 43, donde dicho cristal es un cristal de liberación controlada farmacéutico sin portador.
45. El anticuerpo cristalizado, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 43, donde dicho anticuerpo cristalizado, o porción de unión al antígeno del mismo, tiene una vida media in vivo mayor que la contraparte soluble de dicho anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo.
- 35 46. El anticuerpo cristalizado, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 43, donde dicho anticuerpo cristalino, o porción de unión al antígeno del mismo, conserva su actividad biológica.
- 40 47. Una composición para la liberación de un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, comprendiendo dicha composición:
- (a) una formulación, donde dicha formulación comprende un anticuerpo cristalizado, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 43-46, y un ingrediente; y
- (b) al menos un portador polimérico.
- 45 48. La composición de acuerdo con la reivindicación 47, donde dicho portador polimérico es un polímero seleccionado entre uno o más del grupo que consiste en: poli ácido acrílico, poli cianoacrilatos, poli aminoácidos, poli anhídridos, poli depsipéptidos, poli ésteres, poli ácido láctico, poli ácido láctico-co-glicólico o PLGA, poli b-hidroxibutirato, poli caprolactona, poli dioxanona; poli metilenglicol, poli hidroxipropilmetacrilamida, poli organofosfazeno, poli ortoésteres, poli alcohol vinílico, poli vinilpirrolidona, copolímeros de anhídrido maleico-éster alquil vinílico, polioles pluronic, albúmina, alginato, celulosa y derivados celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, combinaciones y copolímeros de los mismos.
- 50 49. La composición de acuerdo con la reivindicación 47, donde dicho ingrediente se selecciona del grupo que consiste en albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, metoxipolietilenglicol y polietilenglicol.
- 55 50. La composición de acuerdo con la reivindicación 47, para su uso como medicamento para el tratamiento de un mamífero.
- 60 51. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23, y un portador farmacéuticamente aceptable.

52. La composición farmacéutica de la reivindicación 51, para su uso como medicamento.
53. La composición farmacéutica de la reivindicación 52, que comprende por añadidura un agente adicional.
- 5 54. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 53, donde dicho agente adicional se selecciona del grupo que consiste en: inhibidores de la angiogénesis; inhibidores de quinasas; bloqueadores de la coestimulación molecular; bloqueadores de moléculas de adherencia; anticuerpos anti-citoquina o fragmentos funcionales de los mismos; metotrexato; corticoesteroides; ciclosporina; rapamicina; FK506; y agentes antiinflamatorios no esteroideos.
- 10 55. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 51-54, donde la composición es para su uso en el tratamiento del asma, LEG, osteoartritis, artritis psoriásica o psoriasis.
- 15 56. Un método para reducir la actividad de IL-18 humana in vitro, comprendiendo el método la etapa de poner en contacto IL-18 humana con el anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23, de manera que se reduzca la actividad de IL-18 humana.
- 20 57. El uso de un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-23, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto humano que sufra una enfermedad autoinmunitaria, donde el anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, es un anticuerpo humano.
- 25 58. El uso de la reivindicación 57, donde la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en asma, LEG, osteoartritis, artritis psoriásica y psoriasis.
- 30 59. El uso de un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-23, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que padezca una enfermedad autoinmunitaria, donde el anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, es un anticuerpo humano y, donde el anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, es para su administración antes, durante, o después de la administración de un segundo agente, donde el segundo agente se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, o fragmento del mismo, capaz de unirse a IL-12 humana; metotrexato; un anticuerpo, o fragmento del mismo, capaz de unirse a TNF humano; corticoesteroides, ciclosporina, rapamicina, FK506, y agentes antiinflamatorios no esteroideos.
- 35 60. El uso de la reivindicación 59, donde la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en asma, LEG, osteoartritis, artritis psoriásica y psoriasis.
- 40 61. El uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 50 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un mamífero que padezca una enfermedad autoinmunitaria, donde el anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, es un anticuerpo humano.
- 45 62. Una composición farmacéutica para el tratamiento de la EPOC que comprende un anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23 y uno o más agentes terapéuticos adicionales para la EPOC.