

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 953**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2006** **E 06718993 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2012** **EP 1851245**

54 Título: **Anticuerpos frente a interleucina-1 beta**

30 Prioridad:

26.01.2005 US 647643 P
22.12.2005 US 753800 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
18.02.2013

73 Titular/es:

AMGEN FREMONT INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US

72 Inventor/es:

GREEN, LARRY;
FAGGIONI, RAFFAELLA;
FOORD, ORIT;
KLAKAMP, SCOTT, L.;
SENALDI, GIORGIO y
SCHNEIDER, AMY, K.

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 395 953 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos frente a interleucina-1 beta

Campo

- 5 La invención se refiere a agentes de unión dirigidos, tales como anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos, con afinidad de unión por interleucina-1 β (IL-1 β) y a usos de estos anticuerpos. Más específicamente, la invención se refiere a anticuerpos monoclonales totalmente humanos dirigidos a IL-1 β y a usos de estos anticuerpos.

Antecedentes

- 10 El sistema inmunitario normal se encuentra en un equilibrio en el que células y moléculas proinflamatorias y antiinflamatorias están reguladas cuidadosamente para promover la defensa inmunitaria normal del huésped sin destruir los tejidos del huésped. Una vez se altera este equilibrio regulador, la estimulación y la activación inespecíficas pueden dar lugar a un aumento de las cantidades de moléculas inmunológicas e inflamatorias destructoras potentes que se producen y liberan. Por tanto, la producción excesiva de citocinas proinflamatorias o la producción de citocinas en el contexto biológico erróneo, se asocian con la morbilidad y la mortalidad en una amplia variedad de enfermedades.

- 15 Las citocinas son polipéptidos pluripotentes que actúan uniéndose a receptores celulares específicos. Su secreción es importante para determinar la duración y la intensidad de una respuesta inmunitaria. Las citocinas tienen efectos pleiotrópicos y median una serie de síntomas asociados con la inflamación.

- 20 La IL-1 β participa en una amplia variedad de rutas biológicas y es una molécula potente, capaz de inducir sus efectos activando tan solo uno o dos receptores por célula. Como agente de señalización, la IL-1 β es eficaz a concentraciones muy bajas, incluso en el intervalo femtomolar. En un primer momento, se observó que la IL-1 β inducía fiebre, aumentaba las respuestas linfocitarias y estimulaba la respuesta de fase aguda. La IL-1 β tiene un papel conocido en la inducción de una reacción inflamatoria en respuesta a la infección.

Sumario

- 25 Las realizaciones de la invención se refieren a agentes de unión dirigidos que se unen específicamente a interleucina-1 β (IL-1 β) y neutralizan la actividad de IL-1 β , en los que dichos agentes de unión dirigidos comprenden una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 74 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 76. En una realización de la invención, el agente de unión dirigido es un anticuerpo totalmente humano, o un fragmento de unión del mismo, que neutraliza la actividad de la interleucina-1 β (IL-1 β). En un aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión totalmente humano neutraliza la interleucina-1 β (IL-1 β) y se une a IL-1 β con una K_D de 400 pM, 100 pM, 10 pM, 1 pM, 500 fM, 300 fM, 200 fM, 50 fM o menos. En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene un isotipo IgG2, mientras que en otras realizaciones el anticuerpo es un isotipo IgG4. En algunas realizaciones, el anticuerpo sufre un cambio de isotipo de un isotipo a otro. En algunas realizaciones, el anticuerpo está asociado con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

- 35 En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a un epítipo de IL-1 β en particular, tal como los aminoácidos 1-34 del dominio N terminal. En otras realizaciones, el agente de unión dirigido se une a IL-1 β en parte a través de una arginina en el cuarto aminoácido del polipéptido de IL-1 β maduro. En algunas realizaciones, el agente de unión dirigido se une a IL-1 β en parte a través de una arginina en el decimoprimer aminoácido del polipéptido de IL-1 β maduro.

- 40 En algunas realizaciones, el agente de unión dirigido es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 74 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 76. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende un polipéptido de cadena ligera que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 76 y un polipéptido de cadena pesada que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 74. En algunas realizaciones, el anticuerpo es el anticuerpo 9.5.2.

- 45 Otra realización de la invención es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 74 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 76 que compite por la unión con cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente.

- 50 Otra realización más es un polinucleótido aislado que codifica un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 74 y un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo, en el que el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 76. En algunas realizaciones, la invención incluye un vector que comprende un polinucleótido descrito anteriormente. En otras realizaciones, la invención incluye una célula huésped que comprende uno de los vectores descritos anteriormente.

Otro aspecto de la invención es el uso de un agente de unión dirigido que neutraliza la actividad biológica de IL-1 β para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno relacionado con IL-1 β en el que dicho

agente de unión dirigido comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 74 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 76. En una realización, el agente de unión dirigido es un anticuerpo. En realizaciones particulares el antagonista es especialmente adecuado para su uso en la antagonización de IL-1 β en pacientes con un tumor que depende, sólo o en parte, de la actividad de IL-1 β . En realizaciones particulares el antagonista es especialmente adecuado para su uso en la antagonización de IL-1 β en pacientes con un trastorno relacionado con IL-1 β seleccionado del grupo que consiste en: trastornos inflamatorios, caquexia y síndrome de fatiga crónica, osteoporosis, aterosclerosis, trastornos relacionados con el dolor, insuficiencia cardíaca congestiva, leucemias, mielomas múltiples, crecimiento tumoral y diseminación metastásica.

En otro aspecto, la invención proporciona un agente de unión dirigido que neutraliza la actividad biológica de IL-1 β para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con IL-1 β , en el que dicho agente de unión dirigido comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 74 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 76. En una realización, el agente de unión dirigido es un anticuerpo. En realizaciones particulares el antagonista es especialmente adecuado para su uso en la antagonización de IL-1 β en pacientes con un tumor que depende, sólo o en parte, de la actividad de IL-1 β . En realizaciones particulares el antagonista es especialmente adecuado para su uso en la antagonización de IL-1 β en pacientes con un trastorno relacionado con IL-1 β seleccionado del grupo que consiste en: trastornos inflamatorios, caquexia y síndrome de fatiga crónica, osteoporosis, aterosclerosis, trastornos relacionados con el dolor, insuficiencia cardíaca congestiva, leucemias, mielomas múltiples, crecimiento tumoral y diseminación metastásica.

Otro aspecto de la invención es el uso de un agente de unión dirigido que neutraliza la actividad biológica de IL-1 β , en el que el agente de unión dirigido comprende un anticuerpo monoclonal neutralizador totalmente humano que se une a los aminoácidos 1-34 del dominio N-terminal de IL-1 β .

La presente solicitud divulga además un procedimiento para tratar de forma eficaz a un animal que padece un trastorno relacionado con IL-1 β , comprendiendo el procedimiento: seleccionar un animal que necesita tratamiento para un trastorno relacionado con IL-1 β ; y administrar al animal una dosis terapéuticamente eficaz de un agente de unión dirigido que neutraliza la actividad biológica de IL-1 β . El trastorno tratable relacionado con IL-1 β se selecciona del grupo que consiste en trastornos inflamatorios, caquexia y síndrome de fatiga crónica, osteoporosis, aterosclerosis, trastornos relacionados con el dolor, insuficiencia cardíaca congestiva, leucemias, mielomas múltiples, crecimiento tumoral y diseminación metastásica. En el procedimiento descrito anteriormente, el agente de unión dirigido puede comprender un anticuerpo monoclonal neutralizador totalmente humano que se une a los aminoácidos 1-34 del dominio N-terminal de IL-1 β .

La presente solicitud divulga además un procedimiento para tratar de forma eficaz a un animal que padece un trastorno relacionado con IL-1 β . El procedimiento incluye seleccionar un animal que necesita tratamiento para un trastorno relacionado con IL-1 β y administrar al animal una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal neutralizador totalmente humano que se une a interleucina-1 β (IL-1 β) con una K_D de 200 fm o menos. El trastorno tratable relacionado con IL-1 β es un trastorno inflamatorio tal como caquexia y síndrome de fatiga crónica, osteoporosis, aterosclerosis, trastornos relacionados con el dolor, insuficiencia cardíaca congestiva, leucemia, mieloma múltiple, crecimiento tumoral o diseminación metastásica.

Realizaciones adicionales de la invención incluyen el uso de un anticuerpo en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno relacionado con IL-1 β en un animal, en el que dicho anticuerpo monoclonal se une específicamente a interleucina-1 β (IL-1 β) y en el que dicho anticuerpo monoclonal comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 74 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 76. Los trastornos tratables relacionados con IL-1 β pueden incluir trastornos inflamatorios, caquexia y síndrome de fatiga crónica, osteoporosis, aterosclerosis, trastornos relacionados con el dolor, insuficiencia cardíaca congestiva, leucemias, mielomas múltiples, crecimiento tumoral y diseminación metastásica. Otra realización de la invención es un agente de unión dirigido que comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 74 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 76, tal como un anticuerpo frente a IL-1 β que comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 74 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 76, para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con IL-1 β , tal como la inflamación.

Otro aspecto de la invención es el uso de un antagonista de la actividad biológica de IL-1 β que comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 74 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 76 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la actividad de IL-1 β relacionada con enfermedades. En una realización, el antagonista es un anticuerpo. En realizaciones particulares el antagonista es especialmente adecuado para su uso en la antagonización de IL-1 β en pacientes con un tumor que depende, sólo o en parte, de la actividad de IL-1 β .

La presente solicitud divulga también procedimientos para tratar enfermedades o afecciones asociadas con la expresión de IL-1 β en un paciente, administrando al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-IL-1 β en combinación con anticuerpos adicionales o fármacos quimioterápicos o tratamiento de radiación. Por ejemplo, se puede administrar una mezcla monoclonal, oligoclonal o policlonal de anticuerpos frente a IL-1 β que bloquean la inflamación en combinación con un fármaco que se ha demostrado que inhibe la inflamación directamente. El procedimiento se puede realizar *in vivo* y, preferentemente, el paciente es un paciente humano. El procedimiento

puede concernir al tratamiento de trastornos inflamatorios tales como caquexia y síndrome de fatiga crónica, osteoporosis, aterosclerosis.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La fig. 1A es un gráfico de barras que presenta el porcentaje de producción de IL-6 inducido por IL-1 β (4 pM) en células MRC-5 en presencia de diversas cantidades de los anticuerpos dados.
- La fig. 1B es un gráfico de barras que presenta el porcentaje de producción de IL-6 inducido por IL-1 β (4 pM) en células MRC-5 en presencia de diversas cantidades de los anticuerpos dados.
- La fig. 1C es un gráfico de barras que presenta el porcentaje de producción de IL-6 inducido por IL-1 β (4 pM) en células MRC-5 en presencia de diversas cantidades de los anticuerpos dados.
- 10 La fig. 1D es un gráfico de barras que presenta el porcentaje de producción de IL-6 inducido por IL-1 β (4 pM) en células MRC-5 en presencia de diversas cantidades de los anticuerpos dados.
- La fig. 2A es un gráfico que representa el porcentaje de inhibición de la producción de IL-6 inducida por IL-1 β en células MRC-5 para diversos anticuerpos.
- 15 La fig. 2B es un gráfico que representa el porcentaje de inhibición de la producción de IL-6 inducida por IL-1 β en células MRC-5 para diversos anticuerpos.
- La fig. 3 es un gráfico que representa el porcentaje de inhibición de la producción de IL-8 inducida por IL-1 β en sangre completa humana para diversos anticuerpos.
- La fig. 4 es un gráfico que representa el porcentaje de inhibición de la producción de IL-6 para el Ac 9.5.2, el Ac 5.5.1 y anakinra (KINERETTM) *in vivo*. Los triángulos verticales representan el 9.5.2 IgG4 y los triángulos invertidos representan el 5.5.1 IgG4.
- 20 La fig. 5 es un modelo estructural que representa la interacción de IL-1 beta con un receptor.
- La fig. 6 es un modelo estructural que representa las zonas de interacción del anticuerpo 9.5.2 y el anticuerpo 5.5.1 con IL-1 beta.
- La fig. 7 es un gráfico que representa la actividad mieloperoxidasa (MPO) en los pulmones de ratones BALB/C tratados con IL-1 β sola o en combinación con el Acm 9.5.2 o un control de isotipo.
- 25

Descripción detallada

- La interleucina-1 β (IL-1 β) es una citocina proinflamatoria que desempeña un papel principal en una amplia variedad de enfermedades, incluidas enfermedades inflamatorias. Se divulgan agentes de unión dirigidos que comprenden una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 74 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 76, tales como anticuerpos monoclonales que comprenden una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 74 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 76, que se unen a y neutralizan la actividad de IL-1 β . En una realización, el agente de unión dirigido es un anticuerpo monoclonal totalmente humano que se une específicamente a IL-1 β . En algunas realizaciones los anticuerpos se unen a IL-1 β con una afinidad especialmente alta. En algunas realizaciones los anticuerpos son muy potentes, bien *in vitro*, *in vivo*, o en ambas situaciones. En algunas realizaciones, el tratamiento con estos anticuerpos puede dar lugar a la inhibición de la producción de IL-6 y/o IL-8 *in vitro*, *in vivo*, o en ambas situaciones.
- 30
- En algunas realizaciones, los anticuerpos divulgados son más potentes, más selectivos, tienen una semivida más larga, o alguna combinación de los mismos, que los antagonistas del receptor de IL-1 recombinante (IL-1Ra) o anakinra (p. ej., KINERETTM). Esto puede ser ventajoso, ya que la eficacia terapéutica de anakinra puede estar limitada por sus propiedades biológicas y farmacocinéticas. Por ejemplo, anakinra evita la unión de IL-1 a su receptor a través de un mecanismo de antagonismo del receptor. Para que anakinra sea eficaz, debe competir con IL-1 en todos los receptores, que son ubicuos y numerosos. Además, anakinra tiene una semivida en circulación corta (4-6 horas) en seres humanos
- 40
- Como se describe en detalle a continuación, se generó y se estudió un conjunto de anticuerpos monoclonales (Acm) totalmente humanos frente a IL-1 β . Un ejemplo de un anticuerpo de este tipo se denomina en el presente documento "9.5.2". El anticuerpo 9.5.2 es un Acm IgG2 λ de alta afinidad (K_D = 204 fM por IgG2 y 181 fM por IgG4) que se une a los residuos 1-34 N-terminales de la moléculas de IL-1 β . El anticuerpo 9.5.2 neutraliza potentemente los efectos dependientes de IL-1 β *in vitro* e *in vivo*. El Acm 9.5.2 inhibe la producción de IL-6 inducida por IL-1 β por células MRC-5 y la producción de IL-8 en sangre completa. En ratones, el Acm 9.5.2 inhibió la producción de MPO e IL-6 inducida por IL-1 β . El Acm 9.5.2 presentó potencias *in vitro* e *in vivo* superiores a las de anakinra. Esto estableció que el bloqueo de IL-1 β con un Acm es un enfoque de neutralización válido que puede ser útil en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.
- 45
- 50

Una realización adicional de la invención es un anticuerpo que compite de forma cruzada por la unión a IL-1 β con los anticuerpos totalmente humanos de la invención, que es un anticuerpo que comprende un polipéptido de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 74 y un polipéptido de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 76. Una realización adicional de la invención es un anticuerpo que se une al mismo epítipo de IL-1 β que los anticuerpos totalmente humanos de la invención, que es un anticuerpo que comprende un polipéptido de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 74 y un polipéptido de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 76.

A continuación se proporcionan otras realizaciones, características y similares relativas a anticuerpos frente a IL-1 β .

Listado de secuencias

La presente solicitud divulga anticuerpos específicos frente a IL-1 β que se enumeran a continuación en la tabla 1. Esta tabla informa del número de identificación ("N.º de ID del Acm") de cada anticuerpo frente a IL-1 β , junto con el número de SEQ ID de la cadena pesada y la cadena ligera correspondientes para las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos. El N.º de ID del Acm se usa para identificar los diversos anticuerpos. Cuando los N.º de ID de los Acm comienzan con el mismo conjunto de dos números (p. ej., 9.5.2 y 9.5) esto indica que los anticuerpos son clones y, por tanto, son idénticos. Las secuencias completas se pueden encontrar en el listado de secuencias y en la tabla 25 y la tabla 26 se puede encontrar una comparación de las secuencias.

Tabla 1

N.º de ID del Acm:	Secuencia	SEQ ID NO:
4.20.1	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	1
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	2
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	3
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	4
5.36.1	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	5
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	6
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	7
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	8
5.5.1	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	9
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	10
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	11
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	12
6.20.1	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	13
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	14
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	15
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	16
6.26.1	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	17
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	18
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	19
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	20
6.33.1	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	21
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	22
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	23
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	24

(continuación)

N.º de ID del Acm:	Secuencia	SEQ ID NO:
6.34.1	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	25
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	26
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	27
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	28
6.7.1	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	29
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	30
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	31
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	32
8.18.1	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	33
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	34
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	35
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	36
8.50.1	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	37
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	38
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	39
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	40
8.59.1	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	41
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	42
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	43
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	44
8.6.1	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	45
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	46
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	47
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	48
9.11.1	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	49
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	50
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	51
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	52
9.19.1	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	53
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	54
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	55
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	56
9.26.1	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	57
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	58
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	59
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	60

(continuación)

N.º de ID del Acm:	Secuencia	SEQ ID NO:
9.2.1	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	61
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	62
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	63
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	64
9.31.1	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	65
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	66
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	67
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	68
9.54.1	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	69
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	70
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	71
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	72
9.5.2	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	73
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	74
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	75
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	76

Definiciones

- 5 A menos que se definan de otro modo, los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tendrán los significados entendidos comúnmente por los expertos en la técnica. Además, a no ser que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán el plural y los términos en plural incluirán el singular. En general, las técnicas de cultivo celular y tisular, biología molecular y química e hibridación de proteínas y oligo o polinucleótidos descritas en el presente documento y las nomenclaturas utilizadas en relación con ellas son las que se conocen bien y se usan comúnmente en la técnica.
- 10 Se usan técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y transformación y cultivos tisulares (p. ej., electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se llevan a cabo comúnmente en la técnica o como se describe en el presente documento. En general, los procedimientos y técnicas anteriores se realizan de acuerdo con procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y
- 15 más específicas que se citan y se analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, p. ej., Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)). Los procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química de síntesis orgánica y química medicinal y farmacéutica descritos en el presente documento y las nomenclaturas utilizadas en relación con ellos son los que se conocen bien y se usan comúnmente en la técnica. Se usan técnicas estándar para síntesis
- 20 químicas, análisis químicos, preparación, formulación y administración farmacéutica y tratamiento de pacientes.

Debe entenderse que, a menos que se indique lo contrario, los siguientes términos, como se utilizan de acuerdo con la presente divulgación, tienen los siguientes significados:

- 25 Los términos "IL-1B", "IL-1b", "IL-1β", "IL-1Beta", "IL-1β" y términos de este tipo similares se refieren a la molécula interleucina-1β. En algunas realizaciones, se incluyen en esta definición los precursores de IL-1β, tales como pro-IL-1β. Un ejemplo de una forma madura de IL-1B se muestra en la SEQ ID NO: 77. Un "anticuerpo frente a IL-1 beta" es un anticuerpo que se une a IL-1 beta. Esto también se puede denominar un anti-IL-1 beta o, de forma un tanto redundante, un anticuerpo anti-IL-1 beta. Estos anticuerpos también se puede designar con su "N.º de ID de Acm", mostrados anteriormente en la tabla 1. Así, cuando sea apropiado, "Acm 9.5.2", "9.5.2" o "9.5.2 Acm", se refieren al anticuerpo. Los anticuerpos se pueden nombrar con números separados mediante puntos o números separados por
- 30 guiones, esta diferencia no implica nada.

El término "neutralizador" en referencia a un anticuerpo se refiere a la capacidad de un anticuerpo para eliminar o reducir significativamente la actividad de un antígeno objetivo. En consecuencia, un anticuerpo frente a IL-1β

"neutralizador" es capaz de eliminar o reducir significativamente la actividad de IL-1 β . Por ejemplo, un anticuerpo frente a IL-1 β neutralizador puede actuar bloqueando la unión de IL-1 β a un receptor de IL-1 de tipo I ("IL-1R"). Mediante el bloqueo de esta unión, se elimina significativamente o completamente la transducción de señales mediada por IL-1 β . Idealmente, un anticuerpo frente a IL-1 β neutralizador inhibe trastornos relacionados con IL-1 β .

En otra realización, el anticuerpo neutralizador evita que la molécula de IL-1 β se una al receptor de IL-1 de tipo II. El receptor de tipo II también se conoce como un receptor señuelo. Por tanto, un anticuerpo neutralizador que evita que IL-1 β se una al receptor de tipo II, pero permite que IL-1 β se una al receptor de tipo I daría lugar a un aumento eficaz de la actividad de IL-1 β . A menos que se indique lo contrario, el receptor de IL-1 se referirá al receptor de tipo I. Como apreciará el experto en la técnica, el anticuerpo puede ser neutralizador para todas las funciones de la proteína. Así, por ejemplo, un anticuerpo frente a IL-1 β puede modificar la producción de IL-6, IL-8 o ambas. Los anticuerpos pueden tener diferentes niveles de potencia para diferentes ensayos. Las potencias que se contemplan incluyen cualquier potencia eficaz, por ejemplo, IC_{50} de menos de 14 nM a 1 nM, de 1 nM a 500 pM, de 500 pM a 1 pM para la inhibición de IL-6; de menos de 2,3 nM a 100 pM, de 100 pM a 70 pM o de 70 a 4 pM para la inhibición de IL-8; y de menos de 51-8, 8-5 o 5 pmol/ratón para la producción de IL-6 *in vivo*.

Como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido aislado" significará un polinucleótido que se ha aislado de su entorno natural. Estos polinucleótidos pueden ser genómicos, ADNc o sintéticos. Preferentemente, los polinucleótidos aislados no están asociados con la totalidad o una porción de los polinucleótidos con los que están asociados en la naturaleza. Los polinucleótidos aislados se pueden enlazar de forma funcional a otro polinucleótido al que no están enlazados en la naturaleza. Además, preferentemente, los polinucleótidos aislados no se presentan en la naturaleza como parte de una secuencia mayor.

El término "proteína aislada" al que se hace referencia en el presente documento significa una proteína que se ha aislado de su entorno natural. Estas proteínas pueden ser derivadas de ADN genómico, ADNc, ADN recombinante, ARN recombinante o de origen sintético o alguna combinación de los mismos, por lo que, en virtud de su origen, fuente o derivación, la "proteína aislada" (1) no está asociada con proteínas que se encuentran en la naturaleza, (2) no tiene otras proteínas de la misma fuente, p. ej. no tiene proteínas murinas, (3) se expresa por una célula de una especie diferente o (4) no se produce en la naturaleza.

El término "polipéptido" se usa en el presente documento como un término genérico para referirse a la proteína nativa, fragmentos o análogos de una secuencia polipeptídica. Por consiguiente, proteína nativa, fragmentos y análogos son especies del género polipéptido. Los polipéptidos preferidos de acuerdo con la invención comprenden las moléculas de inmunoglobulina humana de cadena pesada y las moléculas de inmunoglobulina humana de cadena ligera kappa, las moléculas de inmunoglobulina humana de cadena pesada y las moléculas de inmunoglobulina humana de cadena ligera lambda, así como moléculas de anticuerpo formadas por combinaciones que comprenden las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada con moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera, tales como las moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera kappa o lambda, y viceversa, así como fragmentos y análogos de las mismas. Los polipéptidos preferidos de acuerdo con la invención también pueden comprender exclusivamente las moléculas de inmunoglobulina humana de cadena pesada o fragmentos de las mismas.

El término "natural" como se usa en el presente documento aplicado a un objeto se refiere al hecho de que se puede encontrar un objeto en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos que está presente en un organismo (incluidos virus) que se puede aislar a partir de una fuente de la naturaleza y que no ha sido modificado intencionadamente por el ser humano en el laboratorio o de otro modo, es natural.

El término "enlazado de forma funcional" como se usa en el presente documento se refiere a posiciones de componentes descritos de forma que se encuentran en una relación que les permite funcionar de la manera pretendida. Por ejemplo, una secuencia de control "enlazada de forma funcional" a una secuencia codificante está conectada de tal forma que se logra la expresión de la secuencia codificante bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

El término "secuencia de control" como se usa en el presente documento se refiere a secuencias polinucleotídicas que son necesarias para efectuar o afectar a la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes a las que están conectadas. La naturaleza de estas secuencias de control difiere en función del organismo huésped; en procariotas, en general, estas secuencias de control incluyen un promotor, un sitio de unión a ribosoma y una secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotas, en general, estas secuencias de control pueden incluir promotores, intrones y una secuencia de terminación de la transcripción. Se pretende que el término "secuencias de control" incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de fusión asociadas.

El término "polinucleótido" como se refiere en el presente documento significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótidos. El término incluye formas mono y bicatenarias de ADN.

El término "oligonucleótido" al que se hace referencia en el presente documento incluye nucleótidos naturales y

modificados, enlazados mediante enlaces naturales y artificiales. Los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos que, en general, comprenden una longitud de 200 bases o menos. Preferentemente, los oligonucleótidos tienen de 10 a 60 bases de longitud y lo más preferentemente de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 a 40 bases de longitud. Habitualmente, los oligonucleótidos son monocatenarios, p. ej., para sondas; aunque los oligonucleótidos pueden ser bicatenarios, p. ej., para su uso en la construcción de un mutante génico. Los oligonucleótidos pueden ser oligonucleótidos sentido o antisentido.

El término "nucleótidos naturales" al que se hace referencia en el presente documento incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término "nucleótidos modificados" al que se hace referencia en el presente documento incluye nucleótidos con grupos azúcar modificados o sustituidos y similares. El término "enlaces de oligonucleótidos" al que se hace referencia en el presente documento incluye enlaces de oligonucleótidos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforanilitioato, fosforaniladato, fosforoamidato y similares. Véanse, p. ej., LaPlanche *et al.* (Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec *et al.* J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984); Stein *et al.* Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988); Zon *et al.* Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon *et al.* Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pág. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford, Inglaterra (1991)); Stec *et al.* la patente de EE. UU. N.º 5.151.510; Uhlmann y Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990). Si se desea, un oligonucleótido puede incluir una marca para su detección.

El término "que hibrida selectivamente" al que se hace referencia en el presente documento significa que se une de forma detectable y específica. Los polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de los mismos hibridan selectivamente con hebras de ácidos nucleicos bajo condiciones de hibridación y lavado que reducen al mínimo las cantidades apreciables de unión a ácidos nucleicos inespecíficos detectable. Se pueden usar condiciones de alta rigurosidad para lograr condiciones de hibridación selectiva como se conocen en la técnica y se analizan en el presente documento. En general, la homología de secuencia de ácidos nucleicos entre los fragmentos de polinucleótidos, oligonucleótidos o anticuerpos y una secuencia de ácidos nucleicos de interés será de al menos el 80 %, y más normalmente con homologías crecientes de al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 99 % y el 100 %.

Dos secuencias de aminoácidos son "homólogas" si existe una identidad parcial o total entre sus secuencias. Por ejemplo, 85 % de homología significa que el 85 % de los aminoácidos son idénticos cuando se alinean dos secuencias para un apareamiento máximo. Se permiten huecos (en cualquiera de las dos secuencias que se aparean) para aumentar al máximo el apareamiento; se prefieren longitudes de hueco de 5 o menos, siendo más preferidas las de 2 o menos. De forma alternativa y preferentemente, dos secuencias proteicas (o secuencias polipeptídicas derivadas de ellas de al menos aproximadamente 30 aminoácidos de longitud) son homólogas, como se usa este término en el presente documento, si tienen una puntuación de alineación de 5 o más (en unidades de desviación estándar) usando el programa ALIGN con la matriz de datos de mutación y una penalización por hueco de 6 o mayor. Véanse Dayhoff, M.O., en Atlas of Protein Sequence and Structure, pág. 101-110 (volumen 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) y el suplemento 2 de este volumen, pág. 1-10. Más preferentemente, las dos secuencias o partes de las mismas son homólogas si sus aminoácidos son un 50 % o más idénticos cuando se alinean de forma óptima usando el programa ALIGN.

El término "corresponde a" se usa en el presente documento para referirse a que una secuencia polinucleotídica es homóloga (es decir, es idéntica, no estrictamente relacionada en la evolución) a la totalidad o una porción de una secuencia polinucleotídica de referencia, o a que una secuencia polipeptídica es idéntica a una secuencia polipeptídica de referencia.

En contraposición, el término "complementaria a" se usa en el presente documento para referirse a que la secuencia complementaria es homóloga a la totalidad o una porción de una secuencia polinucleotídica de referencia. Para ilustración, la secuencia de nucleótidos "TATAC" corresponde a una secuencia de referencia "TATAC" y es complementaria a una secuencia de referencia "GTATA".

Los términos siguientes se usan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más secuencias de polinucleótidos o aminoácidos: "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida usada como base para una comparación de secuencia. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia mayor, por ejemplo, como un segmento de un ADNc o una secuencia génica de longitud completa dados en un listado de secuencias, o puede comprender un ADNc o una secuencia génica completos. En general, una secuencia de referencia tiene al menos 18 nucleótidos o 6 aminoácidos de longitud, frecuentemente al menos 24 nucleótidos o 8 aminoácidos de longitud y a menudo al menos 48 nucleótidos o 16 aminoácidos de longitud. Dado que dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos pueden (1) comprender cada una una secuencia (es decir, una porción de la secuencia de polinucleótidos o aminoácidos completa) que es similar entre las dos moléculas y (2) pueden comprender además una secuencia que es divergente entre las dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) moléculas se realizan normalmente comparando secuencias de las dos moléculas a lo largo de una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento conceptual de al menos 18 posiciones de nucleótido contiguas o aproximadamente 6 aminoácidos en el que la secuencia de polinucleótidos o la secuencia de aminoácidos se compara con una secuencia de referencia de al menos 18 nucleótidos contiguos o 6 aminoácidos y en el que la

porción de la secuencia de polinucleótidos de la ventana de comparación puede incluir adiciones, deleciones, sustituciones y similares (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación se puede llevar a cabo mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:2444 (1988), mediante implementaciones por ordenador de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA del Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), los paquetes informáticos GENEWORKS™ o MACVECTOR®) o mediante inspección, y se selecciona la mejor alineación (es decir, la que da como resultado el mayor porcentaje de homología a lo largo de la ventana de comparación) generada mediante los diversos procedimientos.

El término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos son idénticas (es decir, nucleótido por nucleótido o residuo por residuo) a lo largo de la ventana de comparación. El término "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas de forma óptima a lo largo de la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que se presenta la misma base de ácido nucleico (p. ej., A, T, C, G, U o I) o residuo de aminoácido en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones apareadas, dividiendo el número de posiciones apareadas entre el número total de posiciones de la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. El término "identidad sustancial" como se usa en el presente documento designa una característica de una secuencia de polinucleótidos o aminoácidos, en la que el polinucleótido o aminoácido comprende una secuencia que tiene al menos el 85 por ciento de identidad de secuencia, preferentemente al menos del 90 al 95 por ciento de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 99 por ciento de identidad de secuencia, en comparación con una secuencia de referencia a lo largo de una ventana de comparación de al menos 18 posiciones de nucleótido (6 aminoácidos), frecuentemente a lo largo de una ventana de al menos 24-48 posiciones de nucleótido (8-16 aminoácidos), en la que el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia que puede incluir deleciones o adiciones que suponen un 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia a lo largo de la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia mayor.

Como se usan en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase Immunology - A Synthesis (2ª edición, E.S. Golub y D.R. Gren, Ed., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Los estereoisómeros (p. ej., D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como aminoácidos α,α -disustituidos, N-alquilaminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos de la presente invención. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetilisina, ϵ -N-acetilisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (p. ej., 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptidos usada en el presente documento, la dirección izquierda es la dirección aminoterminal y la dirección derecha es la dirección carboxiterminal, de acuerdo con el uso y las convenciones estándar. Adicionalmente, también se usa la notación abreviada para aminoácidos y sustituciones de aminoácidos. Como tal, "aminoácido, posición de aminoácido, aminoácido" representa el aminoácido natural, la posición de ese aminoácido y el residuo con el que se ha reemplazado el aminoácido. Así, A472Y significa que la alanina original de la posición 472 se ha reemplazado con un triptófano.

De forma similar, a menos que se especifique lo contrario, el extremo izquierdo de secuencias polinucleotídicas monocatenarias es el extremo 5'; la dirección izquierda de secuencias polinucleotídicas bicatenarias se denomina la dirección 5'. La dirección de la adición de 5' a 3' de transcritos de ARN nacientes se denomina la dirección de la transcripción; las regiones de la secuencia de la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en 5' con respecto al extremo 5' del transcrito de ARN se denominan "secuencias corriente arriba"; las regiones de la secuencia de la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en 3' con respecto al extremo 3' del transcrito de ARN se denominan "secuencias corriente abajo".

Aplicado a polipéptidos, el término "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean de forma óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten al menos el 80 por ciento de identidad de secuencia, preferentemente al menos el 90 por ciento de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 95 de identidad de secuencia y lo más preferentemente al menos el 99 por ciento de identidad de secuencia. Preferentemente, las posiciones de residuo que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservadoras. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras se refieren a la posibilidad de intercambiar residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales hidroxialifáticas es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina.

Los grupos preferidos de sustituciones de aminoácidos conservadoras son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutámico-aspartico y asparagina-glutamina.

Como se analiza en el presente documento, las variaciones menores en las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos o las moléculas de inmunoglobulina se contemplan como englobadas por la presente invención, con la condición de que las variaciones en la secuencia de aminoácidos mantengan al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, el 90 %, el 95 % y lo más preferentemente el 99 % de identidad de secuencia con los anticuerpos o las moléculas de inmunoglobulina descritos en el presente documento. En particular, se contemplan reemplazos de aminoácidos conservadores. Los reemplazos conservadores son los que se producen dentro de una familia de aminoácidos que tienen cadenas laterales relacionadas. Los aminoácidos codificados genéticamente se dividen de forma general en familias: (1) ácidos=aspartato, glutamato; (2) básicos=lisina, arginina, histidina; (3) no polares=alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares no cargados=glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Las familias más preferidas son: serina y treonina, que forman una familia hidroxil-alifática; asparagina y glutamina, que forman una familia que contiene amida; alanina, valina, leucina e isoleucina, que forma una familia alifática; y fenilalanina, triptófano y tirosina, que forman una familia aromática. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado no tenga un efecto considerable sobre la función o las propiedades de unión de la molécula resultante, especialmente si el reemplazo no implica un aminoácido de un sitio estructural. Se puede determinar fácilmente si un cambio de aminoácido da lugar a un péptido funcional sometiendo a ensayo la actividad específica del derivado polipeptídico. Los ensayos se describen con detalle en el presente documento. Los expertos en la técnica pueden preparar fácilmente fragmentos o análogos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina. Los extremos amino y carboxilo de fragmentos o análogos se encuentran cerca de los márgenes de dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales se pueden identificar comparando los datos de la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos con bases de datos de secuencias públicas o privadas. Preferentemente, se usan procedimientos de comparación por ordenador para identificar motivos de secuencias o dominios de conformación de proteínas predichos que aparecen en otras proteínas de estructura y/o función conocidas. Se conocen procedimientos para identificar secuencias de proteínas que se pliegan con una estructura tridimensional conocida. Bowie *et al.* Science 253:164 (1991). Por tanto, los ejemplos anteriores demuestran que los expertos en la técnica pueden reconocer motivos de secuencia y conformaciones estructurales que se pueden usar para definir dominios estructurales y funcionales de acuerdo con los anticuerpos descritos en el presente documento.

Las sustituciones de aminoácidos preferidas son las que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) modifican la afinidad de unión para formar complejos de proteínas, (4) modifican las afinidades de unión y (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de estos análogos. Los análogos pueden incluir diversas muteínas de una secuencia distinta de la secuencia peptídica natural. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples (preferentemente, sustituciones de aminoácidos conservadoras) en la secuencia natural (preferentemente en la porción del polipéptido no incluida en el/los dominio(s) que forma(n) contactos intermoleculares). Una sustitución de aminoácidos conservadora no debería cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia original (p. ej., un aminoácido de reemplazo no debería tender a romper una hélice que se produce en la secuencia original o a alterar otros tipos de estructura secundaria que caracterizan a la secuencia original). Se describen ejemplos de estructuras polipeptídicas secundarias y terciarias reconocidas en la técnica en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, ed., Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)); y Thornton *et al.* Nature 354:105 (1991).

El término "fragmento polipeptídico" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que tiene una delección aminoterminal y/o carboxiterminal, pero donde la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia natural deducida, por ejemplo, a partir de una secuencia de ADNc de longitud completa. Normalmente, los fragmentos tienen al menos 5, 6, 8 o 10 aminoácidos de longitud, preferentemente al menos 14 aminoácidos de longitud, más preferentemente al menos 20 aminoácidos de longitud, habitualmente al menos 50 aminoácidos de longitud e incluso más preferentemente al menos 70 aminoácidos de longitud. El término "análogo" como se usa en el presente documento se refiere a polipéptidos que comprenden un segmento de al menos 25 aminoácidos que tiene identidad sustancial con una porción de una secuencia de aminoácidos deducida y que tienen al menos una de las siguientes propiedades: (1) unión específica a IL-1 β , bajo condiciones de unión adecuadas, (2) capacidad para bloquear la unión apropiada a IL-1 β o (3) capacidad para inhibir la actividad de IL-1 β . Normalmente, los análogos de polipéptidos comprenden una sustitución de aminoácido (o adición o delección) conservadora con respecto a la secuencia natural. Normalmente, los análogos tienen al menos 20 aminoácidos de longitud, preferentemente al menos 50 aminoácidos de longitud o más, y con frecuencia pueden ser tan largos como un polipéptido natural de longitud completa.

En la industria farmacéutica se usan frecuentemente análogos peptídicos como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido molde. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "miméticos peptídicos" o "peptidomiméticos". Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986); Veber y Freidinger TINS pág. 392 (1985); y Evans *et al.* J. Med. Chem. 30:1229 (1987). Frecuentemente, estos compuestos se desarrollan con la

ayuda del modelado molecular por ordenador. Se pueden usar miméticos peptídicos que son estructuralmente similares a los péptidos terapéuticamente útiles para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. En general, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigmático (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica), tal como un anticuerpo humano, pero tienen uno o más enlaces peptídicos reemplazados opcionalmente por un enlace seleccionado del grupo que consiste en -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH- (cis y trans), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- y -CH₂SO-, mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Se puede usar la sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso por un D-aminoácido del mismo tipo (p. ej., D-lisina en lugar de L-lisina) para generar péptidos más estables. Además, se pueden generar péptidos constreñidos que comprenden una secuencia consenso o una variación de una secuencia consenso sustancialmente idéntica mediante procedimientos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992), por ejemplo, añadiendo residuos de cisteína internos que pueden formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido o grupo de polipéptidos que comprenden al menos un dominio de unión, donde un dominio de unión de un anticuerpo se forma a partir del plegamiento de dominios variables de una molécula de anticuerpo para formar espacios de unión tridimensionales con una forma de superficie interna y una distribución de cargas complementarias a las características de un determinante antigénico de un antígeno. Normalmente, un anticuerpo tiene una forma tetramérica, que comprende dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" y una "pesada". Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman un sitio de unión de anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, el término "dosis unitaria" se refiere a una cantidad de una sustancia suficiente para lograr un resultado deseado en un sujeto en particular. Así, las dosis unitarias pueden variar en función de la sustancia en particular de la dosis unitaria, quién vaya a tomar la sustancia y cuál sea el resultado deseado.

Como se usa en el presente documento, un "agente de unión dirigido" es un anticuerpo, o fragmento de unión del mismo, que se une de forma preferente a un sitio objetivo. En una realización, el agente de unión dirigido es específico para un solo sitio objetivo. En otras realizaciones, el agente de unión dirigido es específico para más de un sitio objetivo. En una realización, el agente de unión dirigido puede ser un anticuerpo monoclonal y el sitio objetivo puede ser un epítipo.

Los "fragmentos de unión" de un anticuerpo se producen mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y anticuerpos monocatenarios. Se entiende que un anticuerpo que no es un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" tiene todos sus sitios de unión idénticos. Un anticuerpo inhibe sustancialmente la adhesión de un receptor a un contrarreceptor cuando un exceso de anticuerpo reduce la cantidad de receptor unido a contrarreceptor en al menos aproximadamente el 20 %, el 40 %, el 60 % o el 80 %, y más habitualmente, en más del 85 % (medido en un ensayo de unión competitivo *in vitro*). Un anticuerpo "completo" se refiere a un anticuerpo que tiene todas las partes que forman un anticuerpo, como se define por la definición de "anticuerpo" anteriormente. Obviamente, las variantes o modificaciones no sustanciales del anticuerpo pueden dar lugar a anticuerpos que son más pequeños que la secuencia del anticuerpo completo.

El término "epítipo" incluye cualquier determinante proteico capaz de unirse de forma específica a una inmunoglobulina o un receptor de linfocitos T. Habitualmente, los determinantes epitópicos consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y pueden tener, aunque no siempre, características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Se dice que un anticuerpo se une a un antígeno cuando la constante de disociación (K_D o K_d) es de menos de o igual a 1 mM, 100 μM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, 10 pM, 1 pM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 500 fM, 100 fM, 10 fM o menos. También se contemplan anticuerpos que compiten por la unión con los anticuerpos divulgados en el presente documento. La competición puede ser directa, por el epítipo entero, o una fracción del epítipo, o la competición puede ser indirecta, donde la unión del anticuerpo evita la unión de los anticuerpos divulgados en el presente documento.

Las expresiones "se une selectivamente" o "se une específicamente" se usan en el presente documento para indicar que el anticuerpo se unirá a una sustancia más fuertemente de lo que se unirá a otra sustancia. No se pretende indicar que el anticuerpo se unirá sólo a una sustancia. Cuando la unión se produce sólo entre una sola sustancia y el anticuerpo, se dice que el anticuerpo se une "de forma exclusiva" a la sustancia.

El término "agente" se usa en el presente documento para designar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto preparado a partir de materiales biológicos.

"Activo" o "actividad" con respecto a un polipéptido de IL-1β se refiere a una porción de un polipéptido de IL-1β que tiene una actividad biológica o inmunológica de un polipéptido de IL-1β nativo. "Biológica" cuando se usa en el presente documento se refiere a una función biológica que resulta de la actividad del polipéptido de IL-1β nativo. Una actividad biológica de IL-1β preferida incluye, por ejemplo, trastornos inflamatorios inducidos por IL-1β.

"Mamífero" cuando se usa en el presente documento se refiere a cualquier animal que se considere un mamífero. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

La digestión de anticuerpos con la enzima papaína da lugar a dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, también conocidos como fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc", que no tiene actividad de unión a antígeno pero tiene la capacidad de cristalizar. La digestión de anticuerpos con la enzima pepsina da lugar al fragmento $F(ab')_2$ en el que los dos brazos de la molécula de anticuerpo permanecen enlazados y comprenden dos sitios de unión a antígeno. El fragmento $F(ab')_2$ tiene la capacidad de entrecruzar antígenos.

"Fv" cuando se usa en el presente documento se refiere al fragmento mínimo de un anticuerpo que mantiene los sitios tanto de reconocimiento de antígeno como de unión a antígeno.

"Fab" cuando se usa en el presente documento se refiere a un fragmento de un anticuerpo que comprende el dominio constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada.

El término "Acm" se refiere a anticuerpo monoclonal.

"Liposoma" cuando se usa en el presente documento se refiere a una vesícula pequeña que puede ser útil para la administración a un mamífero de fármacos que pueden incluir el polipéptido de IL-1 β de la invención o anticuerpos frente a dicho polipéptido de IL-1 β .

"Marcar" o "marcado" como se usa en el presente documento se refiere a la adición de un resto detectable a un polipéptido, por ejemplo, una radiomarca, una marca fluorescente, una marca enzimática marcada de forma quimioluminiscente o un grupo biotínico. Los radioisótopos o radionúclidos pueden incluir 3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , las marcas fluorescentes pueden incluir rodamina, lantano, fósforo o FITC y las marcas enzimáticas pueden incluir peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa y fosfatasa alcalina.

El término "fármaco o agente farmacéutico" como se usa en el presente documento se refiere a una composición o compuesto químico capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra correctamente a un paciente. Otros términos químicos del presente documento se usan de acuerdo con el uso convencional de la técnica, como se ejemplifica por The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Como se usa en el presente documento, "sustancialmente puro" significa que una especie objetivo es la especie presente predominante (es decir, en una base molar, es más abundante que cualquier otra especie de la composición) y, preferentemente, una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie objetivo comprende al menos aproximadamente el 50 por ciento (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En general, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente el 80 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, más preferentemente más de aproximadamente el 85 %, el 90 %, el 95 % y el 99 %. Lo más preferentemente, la especie objetivo se purifica hasta una homogeneidad esencial (no se pueden detectar especies contaminantes en la composición mediante procedimientos de detección convencionales) en la que la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular.

El término "paciente" incluye sujetos humanos y veterinarios.

Anticuerpos humanos y humanización de anticuerpos

Los anticuerpos humanos evitan algunos de los problemas asociados con anticuerpos que poseen regiones variables y/o constantes de rata o murinas. La presencia de estas proteínas derivadas de rata o murinas puede dar lugar a la eliminación rápida de los anticuerpos o puede dar lugar a la generación de una respuesta inmunitaria frente al anticuerpo por un paciente. Para evitar la utilización de anticuerpos derivados de rata o murinos, se pueden generar anticuerpos totalmente humanos a través de la introducción de locus de anticuerpos humanos funcionales en un roedor u otro mamífero o animal, de forma que el roedor u otro mamífero o animal, produce anticuerpos totalmente humanos.

Un procedimiento para generar anticuerpos totalmente humanos es a través del uso de cepas de ratones XENOMOUSE[®] que se han genomanipulado para que contengan fragmentos de configuración de línea germinal con un tamaño de 245 kb y 190 kb del locus de cadena pesada y el locus de cadena ligera kappa humanos. Otras cepas de ratones XenoMouse contienen fragmentos de configuración de línea germinal con un tamaño de 980 kb y 800 del locus de cadena pesada y el locus de cadena ligera kappa humanos. Otras cepas más de ratones XenoMouse contienen fragmentos de configuración de línea germinal con un tamaño de 980 kb y 800 del locus de cadena pesada y el locus de cadena ligera kappa humanos más un locus de cadena ligera lambda humano completo configurado de línea germinal con un tamaño de 740 kb. Véanse Mendez *et al.* Nature Genetics 15:146-156 (1997) y Green y Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495 (1998). Las cepas XENOMOUSE[®] están disponibles de Abgenix, Inc. (Fremont, CA).

La producción de XENOMOUSE[®] se analiza y se describe con más detalle en las solicitudes de patente de EE. UU.

- con número de serie 07/466.008, presentada el 12 de enero de 1990, 07/610.515, presentada el 8 de noviembre de 1990, 07/ 610.515 presentada el 24 de julio de 1992, 07/922.649, presentada el 30 de julio de 1992, 08/031.801, presentada el 15 de marzo de 1993, 08/112.848, presentada el 27 de agosto de 1993, 08/234.145, presentada el 28 de abril de 1994, 08/376.279, presentada el 20 de enero de 1995, 08/430. 938, el 27 de abril de 1995, 08/464.584, presentada el 5 de junio de 1995, 08/464.582, presentada el 5 de junio de 1995, 08/463.191, presentada el 5 de junio de 1995, 08/462.837, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486.853, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486.857, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486.859, presentada el 5 de junio de 1995, 08/462.513, presentada el 5 de junio de 1995, 08/724.752, presentada el 2 de octubre de 1996 y 08/759.620, presentada el 3 de diciembre de 1996, la publicación de patente de EE. UU. 2003/0217373, presentada el 20 de noviembre de 2002 y las patentes de EE. UU. N.º 6.833.628, 6.162.963, 6.150.584, 6.114.598, 6.075.181 y 5.939.598 y las patentes japonesas N.º 3 068 180 B2, 3 068 506 B2 y 3 068 507 B2. Véanse también la patente europea N.º EP 0 463 151 B1, con publicación concedida el 12 de junio de 1996, la solicitud de patente internacional N.º WO 94/02602, publicada el 3 de febrero de 1994, las solicitudes de patente internacional N.º WO 96/34096, publicada el 31 de octubre de 1996, WO 98/24893, publicada el 11 de junio de 1998 y WO 00/76310, publicada el 21 de diciembre de 2000.
- En un enfoque alternativo, otros, en los que se incluye GenPharm International, Inc., han utilizado un enfoque de "minilocus". En el enfoque de minilocus, se imita un locus de Ig exógeno a través de la inclusión de piezas (genes individuales) del locus de Ig. Así, 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 (preferentemente una región constante gamma) en una construcción para su inserción en un animal. Este enfoque se describe en la patente de EE. UU. N.º 5.545.807 de Surani *et al.* y en las patentes de EE. UU. N.º 5.545.806, 5.545.806, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650, 5.814.318, 5.877.397, 5.874.299 y 6.255.458 todas ellas de Lonberg y Kay, las patentes de EE. UU. N.º 5.591.669 y 6.023.010 de Krimpenfort y Berns, las patentes de EE. UU. N.º 5.612.205, 5.721.367 y 5.789.215 de Berns *et al.* y la patente de EE. UU. N.º 5.643.763 de Choi y Dunn y las solicitudes de patente de EE. UU. de GenPharm International con número de serie 07/574.748, presentada el 29 de agosto de 1990, 07/575.962, presentada el 31 de agosto de 1990, 07/810.279, presentada el 17 de diciembre de 1991, 07/853.408, presentada el 18 de marzo de 1992, 07/904.068, presentada el 23 de junio de 1992, 07/990.860, presentada el 16 de diciembre de 1992, 08/053.131, presentada el 26 de abril de 1993, 08/096.762, presentada el 22 de julio de 1993, 08/155.301, presentada el 18 de noviembre de 1993, 08/161.739, presentada el 3 de diciembre de 1993, 08/165.699, presentada el 10 de diciembre de 1993, 08/209.741, presentada el 9 de marzo de 1994. Véanse también la solicitud de patente europea N.º 0 546 073 B1, las solicitudes de patente internacional N.º WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 y WO 98/24884 y la patente de EE. UU. N.º 5.981.175. Véanse además Taylor *et al.*, 1992, Chen *et al.*, 1993, Tuaillon *et al.*, 1993, Choi *et al.*, 1993, Lonberg *et al.*, (1994), Taylor *et al.*, (1994) y Tuaillon *et al.*, (1995), Fishwild *et al.*, (1996).
- Kirin también ha demostrado la generación de anticuerpos humanos a partir de ratones en los que se han introducido partes grandes de cromosomas o cromosomas enteros a través de fusión microcelular. Véanse las solicitudes de patente europea N.º 773 288 y 843 961. Adicionalmente, se han generado ratones KMTM, que son el resultado del cruce de ratones Tc de Kirin con ratones con minilocus (Humab) de Medarex. Estos ratones poseen el transcromosoma HC de los ratones de Kirin y el transgén de cadena kappa de los ratones de Genpharm (Ishida *et al.*, Cloning Stem Cells, (2002) 4:91-102).
- También se pueden derivar anticuerpos humanos mediante procedimientos *in vitro*. Los ejemplos adecuados incluyen, entre otros, presentación en fagos (CAT, Morphosys, Dyax, Biosite/Medarex, Xoma, Symphogen, Alexion (anteriormente Proliferon), Affimed) presentación en ribosomas (CAT), presentación en levaduras y similares.

Preparación de anticuerpos

- Los anticuerpos, como se describen en el presente documento, se prepararon a través de la utilización de la tecnología XENOMOUSE[®], como se describe a continuación. Después, los ratones de este tipo, son capaces de producir moléculas de inmunoglobulina y anticuerpos humanos y son deficientes en la producción de moléculas de inmunoglobulina y anticuerpos murinos. Las tecnologías utilizadas para lograrlo se divulgan en las patentes, solicitudes y referencias divulgadas en la sección de antecedentes del presente documento. En particular, no obstante, se divulga una realización preferida de producción transgénica de ratones y anticuerpos a partir de los mismos en la patente de EE. UU. con N.º de serie 08/759.620, presentada el 3 de diciembre de 1996 y las solicitudes de patente internacional N.º WO 98/24893, publicada el 11 de junio de 1998 y WO 00/76310, publicada el 21 de diciembre de 2000, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia. Véase también Mendez *et al.* Nature Genetics 15:146-156 (1997).
- A través del uso de esta tecnología, se han producido anticuerpos monoclonales totalmente humanos frente a una variedad de antígenos. Esencialmente, se inmunizan líneas de ratones XENOMOUSE[®] con un antígeno de interés (p. ej. IL-1 β), se recuperan células linfáticas (tales como linfocitos B) de los ratones que expresan anticuerpos y se fusionan las líneas celulares recuperadas con una línea celular de tipo mieloide para preparar líneas celulares de hibridoma inmortales. Estas líneas celulares de hibridoma se rastrean y se seleccionan para identificar líneas celulares que producen anticuerpos específicos frente al antígeno de interés. En el presente documento se proporcionan procedimientos para la producción de varias líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos específicos frente a IL-1 β . Además, en el presente documento se proporciona la caracterización de los anticuerpos

producidos por dichas líneas celulares, incluido el análisis de las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de las cadenas pesadas y ligeras de dichos anticuerpos.

De forma alternativa, en lugar de fusionarlos con células de mieloma para generar hibridomas, los linfocitos B se pueden someter a ensayo directamente. Por ejemplo, se pueden aislar linfocitos B CD19+ a partir de ratones XENOMOUSE® hiperinmunes y dejar que proliferen y se diferencien a células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Después, se rastrean los anticuerpos de los sobrenadantes celulares mediante ELISA para detectar su reactividad frente al inmunógeno IL-1 β . Los sobrenadantes también se pueden rastrear para detectar la inmunorreactividad frente a fragmentos de IL-1 β para mapear adicionalmente la unión de los diferentes anticuerpos a dominios de interés funcional de IL-1 β . Los anticuerpos también se pueden rastrear frente a otras interleucinas humanas relacionadas y frente a los ortólogos de IL-1 β de rata, de ratón y de primate no humano, como de macaco de Java, los últimos para determinar la reactividad de especie cruzada. Se pueden immortalizar linfocitos B de pocillos que contienen anticuerpos de interés mediante fusión para preparar hibridomas a partir de pocillos individuales o agrupados, o immortalizarse mediante infección con VEB o transfección con genes immortalizadores conocidos y plaquearlos después en medio adecuado. De forma alternativa, después se aíslan células plasmáticas individuales secretoras de anticuerpos con las especificidades deseadas usando un ensayo de placa hemolítica específico de IL-1 β (Babcock *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-48 (1996)). Preferentemente, las células objetivo de la lisis son eritrocitos de oveja (SRBC) recubiertos con el antígeno de IL-1 β .

En presencia de un cultivo de linfocitos B que contiene células plasmáticas que secretan la inmunoglobulina de interés y complemento, la formación de una placa indica la lisis específica mediada por IL-1 β de los eritrocitos de oveja que rodean a la célula plasmática de interés. Se puede aislar la célula plasmática individual específica de antígeno del centro de la placa y la información genética que codifica la especificidad del anticuerpo se aísla a partir de la célula plasmática individual. Usando la transcriptasa inversa seguida de PCR (RT-PCR), se puede clonar el ADN que codifica las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo. Este ADN clonado se puede insertar después adicionalmente en un vector de expresión adecuado, preferentemente un casete de vector tal como un pADNc, más preferentemente un vector pADNc de este tipo que contenga los dominios constantes de la cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina. Después, puede transfectarse el vector generado a células huésped, p. ej., células HEK293, células CHO, y cultivarlo en medios de nutrientes convencionales modificados según convenga para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

En general, los anticuerpos producidos por los hibridomas fusionados fueron cadenas pesadas de IgG4 humana con cadenas ligeras lambda o kappa totalmente humanas. Los anticuerpos descritos en el presente documento poseen cadenas pesadas de IgG4 humana, así como cadenas pesadas de IgG2. Los anticuerpos también pueden ser de otros isotipos humanos, incluido IgG1. Los anticuerpos poseían altas afinidades, poseyendo normalmente una K_D de desde aproximadamente 10^{-6} hasta aproximadamente 10^{-13} M o menos, cuando se mide mediante técnicas en fase sólida y en fase en solución. Se prefieren anticuerpos que poseen una K_D de no más de 10^{-11} M para inhibir la actividad de IL-1 β .

Como se apreciará, se pueden expresar anticuerpos anti-IL-1 β en líneas celulares distintas de las líneas celulares de hibridoma. Se pueden usar secuencias que codifican anticuerpos concretos para transformar una célula huésped de mamífero adecuada. La transformación puede ser mediante cualquier procedimiento conocido para la introducción de polinucleótidos en una célula huésped, incluido, por ejemplo, el empaquetado del polinucleótido en un virus (o en un vector vírico) y la transducción de una célula huésped con el virus (o vector), o mediante procedimientos de transfección conocidos en la técnica, como se ejemplifica por las patentes de EE. UU. N.º 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455. El procedimiento de transformación usado depende del huésped que se va a transformar. En la técnica se conocen bien procedimientos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamíferos, e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del/de los polinucleótido(s) en liposomas y microinyección directa del ADN en núcleos.

En la técnica se conocen bien líneas celulares de mamíferos disponibles como huéspedes para la expresión, e incluyen muchas líneas celulares immortalizadas disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC), que incluyen, entre otras, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p. ej., Hep G2) y otras muchas líneas celulares. Las líneas celulares de especial preferencia se seleccionan a través de la determinación de qué líneas celulares tienen niveles de expresión altos y produce anticuerpos con propiedades constitutivas de unión a IL-1 β .

Los anticuerpos anti-IL-1 β son útiles en la detección de IL-1 β en muestras de pacientes y, en consecuencia, son útiles como diagnóstico para estados de enfermedad como se describe en el presente documento. Además, basándose en su capacidad para neutralizar significativamente la actividad de IL-1 β (como se demuestra en los ejemplos que figuran a continuación), los anticuerpos anti-IL-1 β tienen efectos terapéuticos en el tratamiento de síntomas y afecciones resultantes de IL-1 β . En realizaciones específicas, los anticuerpos y procedimientos del presente documento se refieren al tratamiento de síntomas resultantes de trastornos inducidos por IL-1 β o trastornos relacionados con IL-1 β . Realizaciones adicionales implican el uso de los anticuerpos y procedimientos descritos en el presente documento para tratar trastornos relacionados con IL-1 β . Los trastornos relacionados con IL-1 β pueden

incluir trastornos inflamatorios, tales como trastornos inflamatorios mediados por inmunidad (IMID), que son afecciones inflamatorias provocadas y mantenidas por una respuesta inmunitaria patológica específica de antígeno. Entre estos trastornos se encuentran diversos tipos de artritis, tales como artritis reumatoide y artritis reumatoide juvenil, espondilitis anquilosante, enfermedad de Still y enfermedad de Behcet. Otros IMID son las enfermedades alérgicas, tales como asma, fiebre del heno y urticaria; enfermedades provocadas por complejos inmunitarios, p. ej., lupus eritematoso sistémico, glomerulonefritis, pénfigo; vasculitis, tal como granulomatosis de Wegener y síndrome de Kawasaki; diferentes tipos de trastornos del tejido conectivo; enfermedad inflamatoria intestinal (p. ej., enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); diabetes insulino dependiente; esclerosis múltiple; psoriasis; uveítis; retinitis; rechazo de injertos; y enfermedad de injerto contra huésped. Los trastornos relacionados con IL-1 β también pueden incluir la patogénesis de trastornos inflamatorios sistémicos, p. ej., sepsis o fiebre mediterránea familiar y el síndrome de Muckle-Wells. También se incluyen la inflamación tisular en afecciones infecciosas, isquémicas, hemorrágicas y traumáticas, p. ej., fascitis, apoplejía, infarto de miocardio y otros órganos (p. ej., pulmón e intestino), SDRA; hepatitis, (p. ej., infecciosa y no infecciosa, aguda y crónica); pancreatitis aguda y crónica; lesiones por reperfusión; lesiones por radiación; reestenosis vascular de diferentes tipos (p. ej., reestenosis coronaria); y lesiones ortopédicas y dentales que van desde la distensión muscular al esguince de ligamentos o la enfermedad periodontal. Los trastornos relacionados con IL-1 β pueden incluir además la patogénesis de alteraciones sistémicas de naturaleza inflamatoria menos evidente, tales como caquexia, síndrome de fatiga crónica, anorexia y alteraciones mentales y del sueño (p. ej., dificultad para el aprendizaje), osteoartritis, osteoporosis, aterosclerosis, fibrosis de órganos (p. ej., fibrosis pulmonar y hepática), enfermedad de Alzheimer, síndromes parkinsonianos, esclerosis lateral amiotrófica y diversas miopatías, que se consideran principalmente de naturaleza degenerativa pero cuya patogénesis incluye componentes inflamatorios. Los trastornos relacionados con IL-1 β pueden incluir hiperalgesia de diversos tipos y dolor relacionado con el cáncer. Los trastornos relacionados con IL-1 β pueden incluir insuficiencia cardíaca congestiva, independientemente de una cardiopatía primaria. Los trastornos relacionados con IL-1 β pueden incluir cáncer, neoplasias hematológicas, p. ej., leucemias y mielomas múltiples; el desarrollo de una serie de tumores sólidos, crecimiento tumoral y diseminación metastásica. Como apreciará el experto en la técnica, en algunas realizaciones, los anticuerpos divulgados en el presente documento se pueden usar no sólo para identificar los trastornos anteriores, sino también para tratar, curar o evitar esos trastornos. Como tal, los procedimientos y composiciones para la detección, el tratamiento, la prevención, etc. de dichos trastornos que implican los anticuerpos divulgados en el presente documento se contemplan para los trastornos anteriores y trastornos relacionados. La lista anterior también puede servir como ejemplos de trastornos tratables relacionados con IL-1 β .

En algunas realizaciones, la producción general de anticuerpos puede implicar la inmunización del animal con IL-1 β , generar anticuerpos (hibridoma, electrofusión celular), confirmar anticuerpos de IgG humana frente a IL-1 β , producir anticuerpos para los ensayos, inhibir la producción de IL-6 inducida por IL-1 β , correr los mejores neutralizadores en un dispositivo de BIACORE para determinar la afinidad, clonar los líderes y secuenciarlos, determinar la potencia de inhibición por los anticuerpos, evaluar la K_D , mapear epítomos, producir Acm y realizar pruebas *in vivo*.

Administración y formulaciones terapéuticas

Las realizaciones de la invención incluyen formulaciones farmacéuticas estériles y medicamentos de anticuerpos anti-IL-1 β que son útiles como tratamientos para enfermedades. Estas formulaciones pueden inhibir la unión de IL-1 β a su receptor, tratando de este modo de forma eficaz afecciones patológicas donde, p. ej., la IL-1 β en suero es anormalmente alta. Preferentemente, los anticuerpos anti-IL-1 β poseen una afinidad adecuada para neutralizar potentemente la IL-1 β y, preferentemente, tienen una duración de acción adecuada para permitir una administración poco frecuente en seres humanos. Una duración de acción prolongada permitirá pautas de administración menos frecuentes y más cómodas a través de vías parenterales alternativas, tales como inyección subcutánea o intramuscular.

Las formulaciones estériles se pueden crear, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y reconstitución del anticuerpo. De forma ordinaria, el anticuerpo se almacenará en forma liofilizada o en solución. En general, las composiciones de anticuerpo terapéuticas se disponen en un recipiente con un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un adaptador que permite recuperar la formulación, tal como un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica. En consecuencia, los agentes de unión dirigidos descritos en el presente documento son útiles para preparar medicamentos para el tratamiento de trastornos relacionados con IL-1 β , tales como la inflamación.

La vía de administración del anticuerpo es acorde con procedimientos conocidos, p. ej., inyección o infusión por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial, intratecal, por inhalación o intralesional, o mediante sistemas de liberación mantenida como se indica a continuación. Preferentemente, el anticuerpo se administra de forma continua por infusión o inyección intravenosa rápida.

Una cantidad eficaz de anticuerpo que se va a emplear de forma terapéutica dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos, la vía de administración y el estado del paciente. En consecuencia, se prefiere que el encargado del tratamiento valore la dosificación y modifique la vía de administración según convenga para obtener el efecto terapéutico óptimo. Normalmente, el profesional clínico administrará anticuerpo hasta que se alcance una dosificación que logre el efecto deseado. El progreso de este tratamiento se sigue fácilmente mediante ensayos convencionales o mediante los ensayos descritos en el presente documento.

Los anticuerpos, como se describe en el presente documento, se pueden preparar en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición terapéutica se puede administrar por vía intravenosa o a través de la nariz o el pulmón, preferentemente como un aerosol líquido o en polvo (liofilizado). La composición también se puede administrar por vía parenteral o subcutánea, según se desee. Cuando se administra de forma sistémica, la composición terapéutica debería ser estéril, sin pirógenos y estar en una solución aceptable para vía parenteral teniendo debidamente en cuenta el pH, la isotonicidad y la estabilidad. Los expertos en la técnica conocen estas condiciones. Brevemente, las formulaciones de dosificación de los compuestos descritos en el presente documento se preparan para su almacenamiento o administración mezclando el compuesto con el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables. Estos materiales no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como TRIS HCl, fosfato, citrato, acetato y otras sales ácidas orgánicas; antioxidantes tales como ácido ascórbico; péptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente diez residuos) tales como poliarginina, proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico o arginina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, incluidos la celulosa o sus derivados, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones tales como sodio y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN, PLURONICS o polietilenglicol.

Las composiciones estériles para su inyección se pueden formular de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional como se describe en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20ª ed, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (2003)). Por ejemplo, se puede desear la disolución o suspensión del compuesto activo en un vehículo tal como agua o aceite vegetal natural como aceite de sésamo, cacahuete o semilla de algodón, o un vehículo graso sintético como oleato de etilo o similar. Se pueden incorporar tampones, conservantes, antioxidantes y similares de acuerdo con la práctica farmacéutica aceptada.

Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el polipéptido, matrices que están en forma de artículos conformados, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación mantenida incluyen poliésteres, hidrogeles (p. ej., poli(2-hidroxietilmetacrilato) como se describe por Langer *et al.*, J. Biomed Mater. Res., (1981) 15:167-277 y Langer, Chem. Tech., (1982) 12:98-105 o poli(vinilalcohol)), polilactidas (en la patente de EE. UU. N.º 3.773.919, documento EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, Biopolymers, (1983) 22:547-556), acetato de etilen-vinilo no degradable (Langer *et al.*, *supra*), copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON Depot™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (en el documento EP 133.988).

Aunque polímeros tales como el acetato de etilen-vinilo y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, algunos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando las proteínas encapsuladas permanecen en el organismo durante mucho tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como consecuencia de la exposición a la humedad a 37 °C, dando lugar a una pérdida de actividad biológica y a posibles cambios en su inmunogenicidad. Se pueden diseñar estrategias racionales para la estabilización de proteínas en función del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de intercambio de disulfuros, se puede lograr la estabilización modificando residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido en humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

Las composiciones de liberación mantenida también incluyen preparaciones de cristales del anticuerpo suspendidos en formulaciones adecuadas capaces de mantener los cristales en suspensión. Estas preparaciones, cuando se inyectan por vía subcutánea o intraperitoneal, pueden producir un efecto de liberación mantenida. Otras composiciones también incluyen anticuerpos atrapados en liposomas. Los liposomas que contienen estos anticuerpos se preparan mediante procedimientos conocidos por sí mismos: en el documento DE 3.218.121; Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1985) 82:3688-3692; Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1980) 77:4030-4034; los documentos EP 52.322, EP 36.676, EP 88.046, EP 143.949 y 142.641; la solicitud de patente japonesa 83-118008; las patentes de EE. UU. N.º 4.485.045 y 4.544.545; y el documento EP 102.324.

La dosificación de la formulación de anticuerpo para un paciente dado la determinará el médico encargado del caso teniendo en cuenta diversos factores que se sabe que modifican la acción de los fármacos, incluidos la gravedad y el tipo de la enfermedad, el peso corporal, el sexo, la dieta, el tiempo y la vía de administración, otras medicaciones y otros factores clínicos pertinentes. Las dosificaciones terapéuticamente eficaces se pueden determinar mediante procedimientos *in vitro* o *in vivo*.

Una cantidad eficaz de los anticuerpos, descritos en el presente documento, que se va a emplear de forma terapéutica dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos, la vía de administración y el estado del paciente. En consecuencia, se prefiere que el encargado del tratamiento valore la dosificación y modifique la vía de administración según convenga para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosis diaria típica puede variar de desde aproximadamente 0,001 mg/kg hasta 100 mg/kg o más, en función de los factores mencionados anteriormente. Normalmente, el profesional clínico administrará el anticuerpo terapéutico hasta que se alcance una dosificación que logre el efecto deseado. El progreso de este tratamiento se sigue fácilmente mediante ensayos

convencionales o como se describe en el presente documento.

Se apreciará que la administración de entidades terapéuticas de acuerdo con las composiciones y procedimientos del presente documento se administrará con vehículos, excipientes y otros agentes adecuados que se incorporan en formulaciones para proporcionar una mejora de la transferencia, la administración, la tolerancia y similares. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, jaleas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tales como Lipofectin[®]), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y de agua en aceite, emulsiones Carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen Carbowax. Cualquiera de las mezclas anteriores puede ser apropiada para tratamientos y terapias de acuerdo con la presente invención, con la condición de que el principio activo de la formulación no se inactive por la formulación y que la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la vía de administración. Véanse también Baldrick P. "Pharmaceutical development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol. Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." J Pharm Sci. 89(8):967-78 (2000), Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998) y las citas que en ellos figuran para información adicional referente a formulaciones, excipientes y vehículos bien conocidos por los farmacéuticos.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos, que incluyen los experimentos llevados a cabo y los resultados conseguidos, se proporcionan con fines meramente ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes de las enseñanzas del presente documento.

Ejemplo 1

Inmunización y valoración

Inmunización

Se usó IL-1 beta recombinante humana (rhIL-1b) obtenida de R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN N.º de cat. 201-LB/CF) como antígeno (mostrado en la SEQ ID NO: 77). Se desarrollaron anticuerpos monoclonales frente a IL-1b inmunizando de forma secuencial ratones XenoMouse[®] (en la patente de EE. UU. N.º: 6.833.268, publicada el 24 de diciembre de 2004 de Green *et al.*, (cepas XenoMouse XMG1(3B3L3), XMG2(XMG2L3) y XMG4 (3C-1, 3C-1L3, cepa XMG4L), Abgenix, Inc. Fremont, CA). Los animales XenoMouse se inmunizaron a través de la almohadilla plantar para todas las inyecciones. El volumen total de cada inyección fue de 50 µl por ratón, 25 µl por almohadilla plantar.

Para la cohorte 1 (10 ratones 3B3L3), la cohorte 2 (10 ratones 3C-1L3) y la cohorte 3 (10 ratones XMG2L3), la inmunización inicial fue con 10 µg de rhIL-1b mezclada 1:1 (v/v) con TITERMAX GOLD[®] (Sigma, Oakville, ON) por ratón. Los refuerzos posteriores se realizaron con 10 µg de rhIL-1b mezclada 1:1 (v/v) con 100 µg de gel de alumbre (Sigma, Oakville, ON) en D-PBS sin pirógenos. El quinto refuerzo consistió en 10 µg de rhIL-1b mezclada 1:1 (v/v) con TITERMAX GOLD[®]. La sexta inyección consistió en 10 µg de rhIL-1b mezclada 1:1 v/v con 100 µg de gel de alumbre. Se realizó un refuerzo final con 10 µg de rhIL-1b en DPBS sin pirógenos, sin adyuvante. Para este protocolo, los ratones XenoMouse se inmunizaron en los días 0, 3, 6, 8, 12, 15, 19, 22 y 25 y las fusiones se realizaron en el día 29.

Para la cohorte 4 (5 ratones XM3C-1), la cohorte 5 (5 ratones 3C-1L3), la cohorte 6 (5 ratones XMG4L), la cohorte 7 (5 ratones XM3C-1), la cohorte 8 (5 ratones 3C-1L3) y la cohorte 9 (5 ratones XMG4L), la primera inyección fue con 10 µg de rhIL-1b en PBS de Dulbecco (DPBS) sin pirógenos mezclada 1:1 (v/v) con TITERMAX GOLD[®] (Sigma, Oakville, ON) por ratón. Los 10 refuerzos siguientes fueron con 10 µg de rhIL-1b en DPBS sin pirógenos, mezclada con 25 µg de Adju-Phos (gel de fosfato de aluminio, N.º de catálogo 1452-250, lote n.º 8937, HCl Biosector) y 10 µg de CpG (15 µl de adyuvante para ratón ImmunEasy, n.º de catálogo 303101; lote n.º 11553042; Qiagen) por ratón. Un refuerzo final consistió en 10 µg de rhIL-1b en DPBS sin pirógenos, sin adyuvante. Para este protocolo, de la cohorte 4 a la cohorte 6, los ratones XenoMouse se inmunizaron en los días 0, 3, 7, 10, 14, 20, 38, 41, 45, 48, 52 y 55 y las fusiones se realizaron en el día 59. Los dos sangrados se realizaron mediante el procedimiento de sangrado retroorbital en el día 22 después del sexto refuerzo y en el día 42 después del octavo refuerzo. Para este protocolo, de la cohorte 7 a la cohorte 9, los ratones XenoMouse se inmunizaron en los días 0, 4, 7, 11, 17, 21, 38, 42, 46, 50, 53 y 57 y las fusiones se realizaron en el día 61. Los dos sangrados se realizaron mediante el procedimiento de sangrado retroorbital en el día 26 después del sexto refuerzo y el día 45 después del octavo refuerzo.

Selección de animales para recogida por valoración

Las valoraciones de anticuerpo frente a IL-1β en suero de ratones XenoMouse inmunizados se determinaron mediante ELISA. Brevemente, se recubrió rhIL-1 beta (1 µg/ml) sobre placas de 96 pocillos de poliestireno de unión universal Costar Labcoat (Corning, Acton, MA) durante la noche a 4 °C en tampón de recubrimiento de antígeno (tampón carbonato 0,1 M, a pH 9,6, NaHCO₃ (PM 84) 8,4 g/l). Al día siguiente, se lavaron las placas tres veces con

5 tampón de lavado (Tween 20 al 0,05 % en PBS 1x) usando un lavador de placas de Biotek. Después, se bloquearon las placas con 200 µl/pocillo de tampón de bloqueo (BSA al 0,5 %, Tween 20 al 0,1 %, tiomersal al 0,01 % en PBS 1x) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Después del bloqueo de una hora, las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado usando un lavador de placas de Biotek. Se valoraron los sueros de ratones XenoMouse
 10 inmunizados con IL-1 beta o animales XenoMouse sin tratamiento en tampón BSA/PBS al 0,5 % a diluciones 1:3 por duplicado a partir de una dilución inicial 1:100. El último pocillo se dejó como blanco. Estas placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h y después se lavaron las placas tres veces con tampón de lavado usando un lavador de placas de Biotek. Se añadió un anticuerpo de cabra anti-IgG humana específico de Fc conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP, Pierce, Rockford, IL) a una concentración final de 1 µg/ml y se incubó durante 1
 15 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado usando un lavador de placas de Biotek. Después del lavado, se revelaron las placas con la adición de sustrato cromógeno TMB (BioFxBSTP-0100-01) durante 10-20 min o hasta que los pocillos de control negativo comienzan a mostrar color. Entonces, se detuvo el ELISA mediante la adición de solución de detención (reactivo de detención para TMB 650 nM (BioFxBSTP-0100-01), reconstituida con 100 ml de H₂O por botella). La valoración específica de cada animal XenoMouse se determinó a partir de la densidad óptica a 650 nm y se muestra en las tablas 2-10 que figuran a continuación. El valor de la valoración es el recíproco de la mayor dilución de los sueros con una lectura de DO que es dos veces la de fondo. Por lo tanto, cuanto mayor fuera el número, mayor era la respuesta inmunitaria humoral frente a IL-1B.

Tabla 2

Grupo 1, ap, 3c-1L3, 10 ratones		
ID del ratón	Después de 4 inyecciones	Después de 6 inyecciones
N946-4	300	100
N947-2	325	2.500
N995-3	325	8.100
N995-5	275	4.500
0001-4	650	20.000
0001-6	600	23.000
0002-2	175	1.800
0003-5	60	7.500
0003-6	20	4.000
0005-3	1.500	21.500
CN(h)	<100	<100
CN(m)	negativo	negativo
CP(m) de sensibilidad	0,4 ng/ml	0,4 ng/ml
CN(h)	3c-5 KLH gp1; bip L487-9; sangrado 16/4/01	
CN(m)	Acm D39.2.1 (11-8); 1 ug/ml Acm anti-hll-1b; Cat MAB601	
CP(m)	Lote GY179121; R&D Systems; comienzo a 1 ug/ml	

20 Tabla 3

Grupo 2, ap, 3b-3L3, 10 ratones		
ID del ratón	Después de 4 inyecciones	Después de 6 inyecciones
N636-9	60	1.300
N642-5	55	9.000
N646-7	2.400	16.000
N711-5	50	500
N714-5	5.000	45.000

ES 2 395 953 T3

(continuación)

Grupo 2, ap, 3b-3L3, 10 ratones		
N716-2	140	2.000
N716-4	7.500	14.000
N729-5	<100	<100
N733-7	1.500	20.000
N736-7	2.500	35.000
CN(h)	<100	<100
CN(m)	negativo	negativo
CP(m) de sensibilidad	0,4 ng/ml	0,4 ng/ml
CN(h)	3b-3 Mn gp1; ap L955-7; sangrado 11/5/01	
CN(m)	Acm D39.2.1 (11-8) 1 ug/ml Acm anti-hll-1b; Cat MAB601	
CP(m)	Lote GY179121; R&D Systems; comienzo a 1 ug/ml	

Tabla 4

Grupo 3, ap, xmg2L3, 9 ratones		
ID del ratón	Después de 4 inyecciones	Después de 6 inyecciones
N701-5	2.100	70.000
N751-3	6.000	100.000
N751-4	22.000	125.000
N751-6	7.000	65.000
N763-1	2.500	67.000
N769-4	21.000	200.000
N770-1	175	68.000
N773-2	800	25.000
N774-2	750	72.900
CN(h)	3.000	3.000
CN(m)	negativo	negativo
CP(m) de sensibilidad	0,4 ng/ml	0,4 ng/ml
CN(h)	xmg2 KLH gp1; ap L627-3; fusión 9/1/01	
CN(m)	Acm D39.1.1 (11-8); 1 ug/ml Acm anti-hll-1b; Cat MAB601	
CP(m)	Lote GY179121; R&D Systems; comienzo a 1ug/ml	

Tabla 5

Grupo 4, ap, xm3C-1, 5 ratones		
ID del ratón	Después de 6 inyecciones	Después de 8 inyecciones
P382-7	50	85
P382-8	40	275
P382-3	55	275
P382-4	75	50

ES 2 395 953 T3

(continuación)

Grupo 4, ap, xm3C-1, 5 ratones		
ID del ratón	Después de 6 inyecciones	Después de 8 inyecciones
P382-6	75	90
CN*	200	200
CP	800	800

Tabla 6

Grupo 5, ap, xm3C-1L3, 5 ratones		
ID del ratón	Después de 6 inyecciones	Después de 8 inyecciones
P375-1	50	250
P375-2	35	400
P376-6	65	425
P420-1	55	150
P420-2	40	750
CN*	175	175
CP	1.000	1.000

Tabla 7

Grupo 6, ap, xmg4L, 5 ratones		
ID del ratón	Después de 6 inyecciones	Después de 8 inyecciones
P528-8	30	30
P531-3	10	900
P531-4	15	100
P531-5	250	100
P531-6	85	70
CN*	85	85
CP	1.300	1.300

5

Tabla 8

Grupo 7, ap, xm3C-1, 5 ratones		
ID del ratón	Después de 6 inyecciones	Después de 8 inyecciones
P525-1	55	Sin sangrado
P527-2	55	50
P527-3	30	55
P527-4	50	200
P527-5	80	55
CN*	175	175
CP	1.000	1.000

Tabla 9

Grupo 8, ap, xm3C-1L3, 5 ratones		
ID del ratón	Después de 4 inyecciones	Después de 6 inyecciones
P420-4	100	225
P447-1	40	1.400
P447-2	30	600
P447-3	95	20
P-447-4	80	25
CN*	150	150
CP	850	850

Tabla 10

Grupo 9, ap, xmg4L, 5 ratones		
ID del ratón	Después de 4 inyecciones	Después de 6 inyecciones
P378-3	20	20
P380-7	15	45
P456-5	55	300
P529-9	40	40
P530-6	40	95
CN*	175	175
CP	850	850

- 5 Para todos los conjuntos de datos (grupos 3 a 9), el CN fue LX015 gp2; ap, xm3C-1; y el CP fue IL-1B (xmg2L3); gp3, ap, (+)1:100.

Ejemplo 2

Recuperación de linfocitos, aislamiento de linfocitos B, fusiones y generación de hibridomas

- 10 Se sacrificaron los ratones inmunizados y se recogieron y agruparon los ganglios linfáticos de cada cohorte. Las células linfáticas se disociaron mediante molienda en DMEM para liberar las células de los tejidos y se suspendieron las células en DMEM. Se contaron las células y se añadieron 0,9 ml de DMEM por 100 millones de linfocitos al precipitado celular para resuspender las células suavemente pero totalmente. Las células se marcaron usando 100 µl de perlas magnéticas CD90+ por 100 millones de células, mediante la incubación de las células con las perlas magnéticas a 4 °C durante 15 minutos. La suspensión de células marcadas magnéticamente que contenía hasta 10⁸
- 15 células positivas (o hasta 2x10⁹ células totales) se cargó en una columna LS+ y se lavó la columna con DMEM. El efluente total se recogió como la fracción negativa para CD90 (se esperaba que la mayoría de estas células fueran linfocitos B).

- 20 La fusión se realizó mezclando linfocitos B enriquecidos lavados de los anteriores y células de mieloma no secretoras P3X63Ag8.653 compradas de la ATCC, n.º de cat. CRL 1580 (Kearney *et al.*, J. Immunol. 123, 1979, 1548-1550) en una proporción de 1:1. La mezcla de células se precipitó suavemente por centrifugación a 800 g. Tras la retirada completa del sobrenadante, las células se trataron con 2-4 ml de solución de pronasa (CalBiochem, n.º de cat. 53702; 0,5 mg/ml en PBS) durante no más de 2 minutos. Después, se añadieron 3-5 ml de FBS para detener la actividad enzimática y se ajustó la suspensión hasta un volumen total de 40 ml usando solución de electrofusión celular, SEFC (sacarosa 0,3 M, Sigma, n.º de cat S7903, acetato de magnesio 0,1 mM, Sigma, n.º de cat M2545,
- 25 acetato de calcio 0,1 mM, Sigma, n.º de cat. C4705). Después de la centrifugación, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 40 ml de SEFC. Esta etapa de lavado se repitió y las células se volvieron a resuspender a una concentración de 2x10⁶ células/ml.

La electrofusión celular se realizó usando un generador de fusión, modelo ECM2001, Genetronic, Inc., San Diego,

CA. El tamaño de la cámara de fusión usada fue de 2,0 ml, usando la siguiente configuración para el instrumento: condición de alineación: voltaje: 50 V, tiempo: 50 s; ruptura de membrana a: voltaje: 3000 V, tiempo: 30 µs; tiempo de espera tras la fusión: 3 s.

Tras la EFC, las suspensiones celulares se retiraron con cuidado de la cámara de fusión bajo condiciones estériles y se transfirieron a un tubo estéril que contenía el mismo volumen de medio de cultivo de hibridomas (DMEM (JRH Biosciences), FBS al 15 % (Hyclone), complementado con L-glutamina, pen/estrep, OPI (oxalacetato, piruvato, insulina bovina) (todos de Sigma) e IL-6 (Boehringer Mannheim)). Las células se incubaron durante 15-30 minutos a 37 °C y después se centrifugaron a 400 g durante cinco minutos. Las células se resuspendieron suavemente en un volumen pequeño de medio de selección de hibridomas (medio de cultivo de hibridomas complementado con HA 0,5x (Sigma, n.º de cat. A9666)) y se ajustó el volumen de forma apropiada con más medio de selección de hibridomas, basándose en un plaqueo final de 5×10^6 linfocitos B totales por placa de 96 pocillos y 200 µl por pocillo. Las células se mezclaron suavemente, se pipetearon en placas de 96 pocillos y se dejaron crecer. En el día 7 o 10, se retiró la mitad del medio y las células se volvieron a alimentar con medio de selección de hibridomas.

Ejemplo 3

Selección de anticuerpos candidatos mediante ELISA

Después de 14 días de cultivo, se rastrearon los sobrenadantes de hibridoma para detectar anticuerpos monoclonales específicos frente a IL-1B. En el rastreo primario, las placas de ELISA (Fisher, N.º de cat. 12-565-136) se recubrieron con 50 µl/pocillo de IL-1b (1 µg/ml) en tampón de recubrimiento (tampón carbonato 0,1 M, a pH 9,6, NaHCO_3 8,4 g/l) y después se incubaron a 4 °C durante la noche. Tras la incubación, se lavaron las placas con tampón de lavado (Tween 20 al 0,05 % en PBS) tres veces. Se añadieron 200 µl/pocillo de tampón de bloqueo (BSA al 0,5 %, Tween 20 al 0,1 %, tiomersal al 0,01 % en PBS 1x) y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 1 h. Tras la incubación, las placas se lavaron con tampón de lavado tres veces. Se añadieron alícuotas (50 µl/pocillo) de sobrenadantes de hibridoma y controles positivos y negativos y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 2 h. El control positivo usado de principio a fin fue suero del ratón XenoMouse inmunizado con hIL-1b pertinente y el control negativo fue suero de la cepa de ratón XenoMouse pertinente inmunizada con KLH. Tras la incubación, se lavaron las placas tres veces con tampón de lavado. Se añadieron 100 µl/pocillo de anticuerpo de detección de cabra anti-hulgGfc-HRP (Caltag, N.º de cat. H10507, la concentración de uso fue de dilución 1:2000) y después se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras la incubación, se lavaron las placas tres veces con tampón de lavado. Se añadieron 100 µl/pocillo de TMB (BioFX Lab. N.º de cat. TMSK-0100-01) y las placas se dejaron revelando durante aproximadamente 10 minutos (hasta que los pocillos de control negativo apenas comenzaban a mostrar color). Después, se añadieron 50 µl/pocillo de solución de detención (solución de detención de TMB (BioFX Lab. N.º de cat. STPR-0100-01) y se leyeron las placas en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 450 nm.

Se retiraron los sobrenadantes de cultivo antiguos de los pocillos de crecimiento de células positivas para hibridoma basados en el rastreo primario y las células de hibridoma positivas para IL-1B se suspendieron con medio de cultivo de hibridoma recién preparado y se transfirieron a placas de 24 pocillos. Tras 2 días de cultivo, estos sobrenadantes estaban listos para un segundo rastreo de confirmación. En el segundo rastreo de confirmación, se rastrearon los positivos del primer rastreo en ELISA directo (descrito anteriormente) y ELISA sándwich, y tres conjuntos de sistemas de detección para cada procedimiento, un conjunto para detección de hlgG, un conjunto para detección de cadena ligera lambda humana (cabra anti-hlg lambda-HRP, Southern Biotechnology, N.º de cat. 2070-05) y el otro conjunto para detección de cadena ligera kappa de Ig humana (cabra anti-hlg kappa-HRP, Southern Biotechnology, N.º de cat. 2060-05) con el fin de demostrar la composición totalmente humana tanto para IgG e Ig kappa o IgG e Ig lambda o IgG e Ig kappa más lambda. Los tres conjuntos de procedimientos de ELISA directo fueron idénticos a las descripciones anteriores, excepto porque los tres anticuerpos de detección diferentes se usaron por separado. Para los ELISA sándwich se usaron placas recubiertas previamente con estreptavidina (N.º de cat M-5432, Sigma). Se añadió tampón de bloqueo (100 µl/pocillo) que contenía 1 µg/ml de rhIL-1b a las placas recubiertas previamente con estreptavidina. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Tras la incubación, las placas se lavaron con tampón de lavado tres veces. Se añadieron 50 µl/pocillo de sobrenadantes de hibridoma (los positivos del primer rastreo) y controles positivos y negativos, y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 2 h. El resto de los procedimientos fueron idénticos a los tres conjuntos de ELISA directos descritos anteriormente.

Todas las coincidencias positivas del ensayo ELISA se contra-rastrearon para analizar su unión a IL-1α mediante ELISA con el fin de excluir los que reaccionaban de forma cruzada con IL-1α. Las placas de ELISA (Fisher, N.º de cat. 12-565-136) se recubrieron con 50 µl/pocillo de hIL-1α recombinante (R&D n.º de cat. 200-LA) en tampón de recubrimiento (tampón carbonato 0,1 M, a pH 9,6, NaHCO_3 8,4 g/l) y después se incubaron a 4 °C durante la noche. El resto de los procedimientos fueron idénticos a los de las descripciones anteriores.

Se generaron 614 anticuerpos monoclonales totalmente humanos de IgG/kappa o IgG/lambda específicos frente a IL-1b. El número de anticuerpos resultantes de este procedimiento se resume en la tabla 11 para cada fusión.

Tabla 11

Ensayo	N.º de fusión	N.º de positivos para hlgG		
Rastreo primario	fusión 1 (3B-3L3)	171		
	fusión 2 (3C-1L3)	120		
	fusión 3(xgm2L3)	447		
	fusión 4(3C-1)	82		
	fusión 5(3C-1 L3)	85		
	fusión 6(xgm4L)	170		
	fusión 7(3C-1)	2		
	fusión 8(3C-1 L3)	99		
	fusión 9(xgm4L)	204		
	fusión 10(3C-1)	5		
	fusión 11 (3C-1 L3)	17		
	fusión 12(xgm4L)	16		
Segundo rastreo	N.º de fusión	hlgG/hkappa	hlgG/hlambda	hlgG/hkappa/hlambda
	fusión 1 (3B-3L3)	51	38	7
	fusión 2 (3C-1 L3)	24	22	0
	fusión 3(xgm2L3)	60	43	12
	fusión 4(3C-1)	24	N/D	N/D
	fusión 5(3C-1 L3)	22	16	4
	fusión 6(xgm4L)	1	108	1
	fusión 7(3C-1)	2	N/D	N/D
	fusión 8(3C-1 L3)	17	36	4
	fusión 9(xgm4L)	1	160	1
	fusión 10(3C-1)	4	0	0
	fusión 11(3C-1L3)	3	4	0
	fusión 12(xgm4L)	0	7	0

5 Todos los anticuerpos monoclonales totalmente humanos de IgG/kappa o IgG/lambda específicos frente a IL-1 β se rastrearon para detectar la unión a IL-1 β de ratón mediante ELISA con el fin de identificar la reactividad cruzada de especies. Las placas de ELISA (Fisher, N.º de cat. 12-565-136) se recubrieron con 50 μ l/pocillo de mL1-1b recombinante (R&D System, IL-1 β de ratón recombinante/IL-1F2, sin vehículo, n.º de cat. 401-ML/CF) o IL-1 β de macaco (R&D System, IL-1 β de macaco rhesus recombinante/IL-1F2, sin vehículo, n.º de cat. 1318-RL/CF), a 2 μ g/ml (obtenido de R&D Systems, n.º de cat. 293-AN-025/CF) en tampón de recubrimiento (tampón carbonato 0,1 M, a pH 9,6, NaHCO₃ 8,4 g/l) y después se incubaron a 4 °C durante la noche. El resto de los procedimientos fueron idénticos a los de las descripciones anteriores. No se encontraron anticuerpos monoclonales totalmente humanos de IgG/kappa o IgG/lambda específicos frente a IL-1 β que presentaran reactividad cruzada de especies.

Ejemplo 4

Neutralización de la producción de IL-6 inducida por IL-1 β por anticuerpos anti-IL-1 β de hibridoma

15 Se rastrearon 343 sobrenadantes de hibridoma que contenían anticuerpos monoclonales específicos frente a IL-1 β para analizar su capacidad de neutralizar la producción de IL-6 inducida por IL-1 β en células MRC-5 (fibroblastos pulmonares). Se sembraron placas de 96 pocillos de fondo plano con 5000 células MRC-5 por pocillo en 100 μ l de MEM, FBS al 1 %. Las placas se incubaron durante 18-20 horas a 37 °C + 5 % de CO₂ para permitir la adherencia celular. Tras la adherencia celular, se retiró el medio de las células y se reemplazó con 100 μ l de muestras de sobrenadantes de hibridoma diluidos 1:2,5 en MEM, FBS al 1 %. Se añadieron 100 μ l de IL-1 β recombinante (R&D

- 5 Systems n.º de cat. 201-LB) hasta una concentración final de 4 pM, dando lugar a una dilución final de 1:5 de las muestras de sobrenadante en la placa. Los pocillos que contenían IL-1 β sola y sobrenadante solo se incluyeron como controles. Después, se incubaron las placas a 37 °C + 5 % de CO₂ durante otras 24 horas. Se recogieron los sobrenadantes y se sometieron a ensayo para analizar los niveles de IL-6 humana mediante ELISA. Se calculó el porcentaje de producción de IL-6 en cada pocillo en comparación con un control de IL-1 β sola (100 % de producción). Las muestras con la capacidad de inhibir la producción de IL-6 en un 35 % o más se consideraron positivas. El número total de sobrenadantes positivos de cada fusión se muestra en la tabla 12 a continuación.

Tabla 12

N.º de grupo	N.º total	Positivos totales
Fusión 4 (3C-1)	23	2
Fusión 5 (3C-1L3)	42	13
Fusión 6 (xgm4L)	96	17
Fusión 7 (3C-1)	2	0
Fusión 8 (3C-1L3)	65	24
Fusión 9 (xgm4L)	96	33
Fusión 10 (3C-1)	4	0
Fusión 11 (3C-1L3)	8	1
Fusión 12 (xgm4L)	7	0

- 10 Los 90 sobrenadantes de hibridoma positivos que contenían anticuerpos frente a IL-1 β se volvieron a rastrear para analizar su capacidad de neutralizar la producción de IL-6 inducida por IL-1 β en células MRC-5 a una dilución final de 1:5, 1:10 y 1:20 de las muestras de sobrenadante en la placa. Los resultados se muestran en las FIG. 1A-1D. Las FIG. 1A-1D son representaciones de gráficos de barras de diversas diluciones de los anticuerpos.

Ejemplo 5

- 15 **Rastreo Biacore de baja resolución de IL-1 β humana de sobrenadantes celulares de hibridoma de 97 Acm**

- 20 Se utilizó la resonancia de plasmón superficial (RPS) sin marcaje, o Biacore, para medir la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Con este fin, se preparó una superficie de alta densidad de anticuerpo de cabra anti-humano sobre un chip Biacore CM5 usando acoplamiento de aminos rutinario. Todos los sobrenadantes celulares de hibridoma se diluyeron dos veces en tampón de desplazamiento HBS-P que contenía 100 μ g/ml de BSA y 10 mg/ml de carboximetildextrano excepto los Acm 8.59 y 9.9, que no se diluyeron. Se capturó cada Acm sobre una superficie independiente usando un tiempo de contacto de 180 segundos y un lavado de 5 minutos para la estabilización del nivel basal del Acm.

- 25 Se inyectó IL-1 β a 118 nM a 25 °C sobre todas las superficies durante 90 segundos, seguido por una disociación de 5 minutos. Se prepararon datos de unión de referenciación doble restando la señal de una celda de flujo de control y restando el flujo basal de una inyección de tampón justo antes de la inyección de IL-1 β . Los datos se ajustaron de forma global a un modelo de interacción 1:1 para determinar la cinética de unión. Los resultados del análisis cinético de la unión a IL-1 β a 25 °C se recogen en la tabla 13 a continuación. Los Acm están ordenados de mayor a menor afinidad.

Tabla 13

Muestra	Cant. capturada (UR)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
9,19	572	$5,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^{-4}$	268
5,5	514	$1,8 \times 10^6$	$5,0 \times 10^{-4}$	278
9,100	230	$6,1 \times 10^5$	$1,7 \times 10^{-4}$	279
9,11	651	$6,9 \times 10^5$	$2,0 \times 10^{-4}$	290
6,33	508	$5,0 \times 10^3$	$1,6 \times 10^{-4}$	320
6,7	325	$1,2 \times 10^6$	$5,6 \times 10^{-4}$	350
9,54	359	$2,3 \times 10^6$	$8,5 \times 10^{-4}$	370

ES 2 395 953 T3

(continuación)

Muestra	Cant. capturada (UR)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
6,20	711	$5,9 \times 10^5$	$2,6 \times 10^{-4}$	441
6,26	686	$9,2 \times 10^5$	$4,4 \times 10^{-4}$	478
9,56	332	$9,2 \times 10^5$	$4,9 \times 10^{-4}$	533
5,12	499	$5,9 \times 10^5$	$3,3 \times 10^{-4}$	559
9,22	422	$5,4 \times 10^5$	$3,3 \times 10^{-4}$	611
8,18	323	$3,5 \times 10^5$	$2,2 \times 10^{-4}$	629
5,36	800	$5,9 \times 10^5$	$4,2 \times 10^{-4}$	712
9,2	500	$9,9 \times 10^5$	$7,4 \times 10^{-4}$	747
6,34	779	$8,1 \times 10^5$	$6,1 \times 10^{-4}$	753
9,26	375	$4,1 \times 10^5$	$3,5 \times 10^{-4}$	854
5,25	268	$6,9 \times 10^5$	$6,0 \times 10^{-4}$	870
9,47	268	$3,3 \times 10^6$	$3,0 \times 10^{-3}$	909 *
9,85	74	$5,8 \times 10^5$	$6,0 \times 10^{-4}$	1034
9,58	428	$2,1 \times 10^6$	$2,2 \times 10^{-3}$	1048 *
8,64	403	$4,2 \times 10^5$	$4,7 \times 10^{-4}$	1119
8,26	402	$6,9 \times 10^5$	$7,9 \times 10^{-4}$	1145
8,6	304	$5,6 \times 10^5$	$6,9 \times 10^{-4}$	1230
5,32	269	$8,0 \times 10^5$	$9,9 \times 10^{-4}$	1237
9,45	77	$1,1 \times 10^6$	$1,4 \times 10^{-3}$	1273
5,35	259	$3,8 \times 10^3$	$5,0 \times 10^{-4}$	1316
6,39	651	$3,7 \times 10^3$	$4,9 \times 10^{-4}$	1324
8,1	360	$3,0 \times 10^5$	$4,1 \times 10^{-4}$	1370
6,80	494	$4,0 \times 10^5$	$5,5 \times 10^{-4}$	1375
8,4	431	$1,1 \times 10^6$	$1,6 \times 10^{-3}$	1455
9,94	299	$4,6 \times 10^5$	$7,3 \times 10^{-4}$	1587
9,5	305	$1,1 \times 10^6$	$1,8 \times 10^{-3}$	1640 *
6,65	357	$4,2 \times 10^5$	$7,0 \times 10^{-4}$	1667
9,71	307	$3,9 \times 10^5$	$6,5 \times 10^{-4}$	1667
9,72	325	$3,7 \times 10^5$	$6,6 \times 10^{-4}$	1784
6,24	649	$1,2 \times 10^6$	$2,2 \times 10^{-3}$	1833
5,24	482	$4,3 \times 10^5$	$8,1 \times 10^{-4}$	1880
8,59	139	$1,9 \times 10^6$	$3,6 \times 10^{-3}$	1895
9,95	408	$3,2 \times 10^5$	$6,3 \times 10^{-4}$	1969
6,85	1160	$3,3 \times 10^3$	$6,5 \times 10^{-4}$	1970
5,2	380	$5,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^{-3}$	2000
9,74	41	$3,5 \times 10^5$	$7,5 \times 10^{-4}$	2140
9,55	260	$3,1 \times 10^5$	$6,8 \times 10^{-4}$	2194
8,59	169	$1,2 \times 10^6$	$2,6 \times 10^{-3}$	2200
9,48	457	$2,9 \times 10^3$	$6,4 \times 10^{-4}$	2207

ES 2 395 953 T3

(continuación)

Muestra	Cant. capturada (UR)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
9,42	396	$3,1 \times 10^5$	$6,9 \times 10^{-4}$	2226
9,76	490	$4,4 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{-3}$	2273
8,11	749	$2,9 \times 10^5$	$7,1 \times 10^{-4}$	2448
9,82	893	$3,8 \times 10^5$	$9,7 \times 10^{-4}$	2553
9,12	526	$3,1 \times 10^5$	$8,0 \times 10^{-4}$	2580
6,61	896	$3,2 \times 10^5$	$8,3 \times 10^{-4}$	2594
9,70	112	$6,1 \times 10^5$	$1,6 \times 10^{-3}$	2623
8,42	279	$3,5 \times 10^5$	$9,4 \times 10^{-4}$	2686
9,3	275	$1,6 \times 10^5$	$4,3 \times 10^{-4}$	2687
9,32	576	$4,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-3}$	2727
5,38	593	$5,6 \times 10^5$	$1,6 \times 10^{-3}$	2857
11,5	468	$4,9 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-3}$	2857
8,62	736	$4,4 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-3}$	3182
6,27	653	$2,5 \times 10^3$	$8,1 \times 10^{-4}$	3240
9,16	565	$2,0 \times 10^6$	$6,7 \times 10^{-3}$	3350
5,23	379	$1,1 \times 10^6$	$3,8 \times 10^{-3}$	3455
6,2	360	$4,7 \times 10^5$	$1,7 \times 10^{-3}$	3617
8,7	392	$4,2 \times 10^5$	$1,6 \times 10^{-3}$	3809
6,58	904	$1,0 \times 10^6$	$4,2 \times 10^{-3}$	4200
9,39	389	$4,6 \times 10^5$	$2,0 \times 10^{-3}$	4348
8,44	412	$4,7 \times 10^5$	$2,1 \times 10^{-3}$	4468
4,20	242	$4,6 \times 10^6$	$2,3 \times 10^{-3}$	5000
5,37	981	$5,8 \times 10^5$	$2,9 \times 10^{-3}$	5000
4,14	652	$2,9 \times 10^5$	$1,5 \times 10^{-3}$	5170
6,45	946	$1,8 \times 10^6$	$1,0 \times 10^{-2}$	5555
9,31	570	$6,6 \times 10^3$	$3,8 \times 10^{-3}$	5760
5,20	798	$1,8 \times 10^6$	$1,1 \times 10^{-2}$	6111
8,5	477	$1,2 \times 10^6$	$7,4 \times 10^{-3}$	6167
8,63	616	$1,3 \times 10^6$	$8,2 \times 10^{-3}$	6307
5,14	598	$3,8 \times 10^5$	$2,4 \times 10^{-3}$	6316
6,15	759	$1,5 \times 10^6$	$9,7 \times 10^{-3}$	6467
8,14	406	$3,5 \times 10^3$	$2,3 \times 10^{-3}$	6571
9,89	456	$6,8 \times 10^5$	$4,7 \times 10^{-3}$	6912
9,38	296	$2,0 \times 10^6$	$1,4 \times 10^{-2}$	7000
4,11	596	$3,3 \times 10^3$	$2,5 \times 10^{-3}$	7580
8,33	615	$2,1 \times 10^6$	$1,6 \times 10^{-2}$	7619
8,52	741	$2,1 \times 10^6$	$1,7 \times 10^{-2}$	8095
8,9	838	$1,4 \times 10^6$	$1,2 \times 10^{-2}$	8571
6,57	1160	$3,1 \times 10^5$	$2,7 \times 10^{-3}$	8710

(continuación)

Muestra	Cant. capturada (UR)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
8,50	473	$3,0 \times 10^6$	$2,7 \times 10^{-2}$	9000
8,61	591	$4,7 \times 10^5$	$5,3 \times 10^{-3}$	$1,13 \times 10^4$
8,17	657	$2,7 \times 10^6$	$3,2 \times 10^{-2}$	$1,18 \times 10^4$
8,21	895	$1,5 \times 10^6$	$1,9 \times 10^{-2}$	$1,27 \times 10^4$
8,55	1010	$1,6 \times 10^6$	$2,1 \times 10^{-1}$	$1,31 \times 10^4$
8,58	624	$4,0 \times 10^5$	$5,5 \times 10^{-3}$	$1,37 \times 10^4$
9,27	222	$2,5 \times 10^5$	$3,7 \times 10^{-3}$	$1,48 \times 10^4$
9,57	454	$1,1 \times 10^6$	$1,7 \times 10^{-2}$	$1,55 \times 10^4$
8,10	718	$1,3 \times 10^6$	$2,4 \times 10^{-2}$	$1,85 \times 10^4$
8,24	878	$1,6 \times 10^6$	$3,1 \times 10^{-2}$	$1,94 \times 10^4$
9,9	454	$7,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^{-2}$	$2,05 \times 10^4$
4,5	530	$9,3 \times 10^5$	$3,0 \times 10^{-2}$	$3,25 \times 10^4$

Los asteriscos junto a los resultados de K_D para los Acm 9.5, 9.58 y 9.47 indican que estas K_D pueden no ser tan fiables como las otras K_D debido al ajuste deficiente de los sensogramas de estos Acm a un modelo de interacción 1:1.

5 Ejemplo 6

Rastreo Biacore de baja resolución de IL-1 β de macaco de sobrenadantes celulares de hibridoma de 20 anticuerpos monoclonales

Con este fin, se preparó una superficie de alta densidad de anticuerpo de cabra anti-humano sobre un chip Biacore CM5 usando acoplamiento de aminos rutinario. Todos los sobrenadantes celulares de hibridoma se diluyeron dos veces en tampón de desplazamiento HBS-P que contenía 100 μ g/ml de BSA y 10 mg/ml de carboximetildextrano. Se capturó cada Acm sobre una superficie independiente usando un tiempo de contacto de 120 segundos y un lavado de 5 minutos para la estabilización del nivel basal del Acm.

Se inyectó IL-1 β de macaco a 117 nM a 25 °C sobre todas las superficies durante 90 segundos, seguido por una disociación de 5 minutos. Se prepararon datos de unión de referenciación doble restando la señal de una celda de flujo de control y restando el flujo basal de una inyección de tampón justo antes de la inyección de IL-1 β . Los datos se ajustaron de forma global a un modelo de interacción 1:1 para determinar la cinética de unión. Los resultados del análisis cinético de la unión a IL-1 β de macaco a 25 °C se recogen en la tabla 14 a continuación. Los Acm están ordenados de mayor a menor afinidad.

Tabla 14

Muestra	Cant. capturada (UR)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
9,19	486	$2,6 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-4}$	0,5
6,33	421	$2,3 \times 10^5$	$1,8 \times 10^{-4}$	0,8
9,11	583	$3,3 \times 10^5$	$2,7 \times 10^{-4}$	0,8
8,18	255	$1,1 \times 10^5$	$9,2 \times 10^{-5}$	0,8
9,5	220	$2,2 \times 10^5$	$2,3 \times 10^{-4}$	1,0
6,26	564	$2,7 \times 10^5$	$3,1 \times 10^{-4}$	1,1
9,26	263	$1,5 \times 10^5$	$2,0 \times 10^{-4}$	1,3
9,54	284	$1,8 \times 10^5$	$3,5 \times 10^{-4}$	1,9
8,50	384	$4,7 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-3}$	2,5
8,59	63	$4,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^{-3}$	3,3
5,36	771	$2,1 \times 10^5$	$7,2 \times 10^{-4}$	3,4

(continuación)

Muestra	Cant. capturada (UR)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
9,2	423	$3,1 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-3}$	4,5*
5,5	438	$2,4 \times 10^3$	$1,1 \times 10^{-3}$	4,6
9,74	28	$9,0 \times 10^4$	$4,3 \times 10^{-4}$	4,8
9,31	442	$3,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^{-3}$	5,0
8,6	262	$1,6 \times 10^5$	$8,5 \times 10^{-4}$	5,3
4,20	115	$8,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^{-3}$	6,3
6,7	41	$3,2 \times 10^5$	$2,5 \times 10^{-3}$	7,8
6,20	635	$2,5 \times 10^5$	$16,1 \times 10^{-3}$	24,4
6,34	772	$3,2 \times 10^5$	$1,8 \times 10^{-2}$	56,2

Ejemplo 7**Caracterización de 24 anticuerpos frente a IL-1 β**

- 5 Se determinaron las características de unión y neutralización de algunos de estos anticuerpos y se resumen en la tabla 15 El procedimiento para determinar las características se analiza con más detalle en el ejemplo 4, anteriormente. Se determinaron las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos para cada uno de los anticuerpos por medios estándar y se proporcionan en el listado de secuencias que se proporciona junto con el presente documento.

Tabla 15

ID del anticuerpo	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)	K_D (pM)	Neutralización (% de producción de IL-6)		
	Resolución media			Baja res.	dil. 1:5	dil. 1:10	dil. 1:20
9,19	6,40E+05	4,00E-05	63	268	5	10	15
9,5	2,60E+06	3,50E-04	130*	1640*	0	0	0
9,11	1,60E+06	2,30E-04	140	290	4	3	10
6,33	9,70E+05	1,40E-04	140	320	13	22	22
9,54	2,50E+06	3,50E-04	140	370	5	21	36
6,20	1,50E+06	2,60E-04	170	441	4	6	11
5,5	3,10E+06	5,70E-04	180	278	1	3	6
6,26	1,90E+06	3,80E-04	200	478	9	8	22
9,100	5,30E+05	1,50E-04	280	279	39	37	36
9,2	1,20E+06	3,50E-04	290	747	4	8	16
6,7	1,30E+06	4,20E-04	320	350	0	17	22
8,18	4,90E+05	2,20E-04	450	629	2	3	9
5,36	1,00E+06	5,80E-04	580	712	6	8	18
8,6	6,60E+05	5,40E-04	820	1230	6	8	23
6,34	N.D.	N.D.	N.D.	753	10	7	20
9,26	N.D.	N.D.	N.D.	854	12	27	27
9,31	N.D.	N.D.	N.D.	5760	6	23	13
9,74	N.D.	N.D.	N.D.	2140	5	24	28

(continuación)

ID del anticuerpo	ka (M ⁻¹ S ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	KD (pM)	KD (pM)	Neutralización (% de producción de IL-6)		
	Resolución media			Baja res.	dil. 1:5	dil. 1:10	dil. 1:20
9,56	N.D.	N.D.	N.D.	533	35	39	76
5,12	N.D.	N.D.	N.D.	559	29	48	62
9,22	N.D.	N.D.	N.D.	611	16	24	51
5,25	N.D.	N.D.	N.D.	870	30	36	39
9,47	N.D.	N.D.	N.D.	909	10	47	86
9,85	N.D.	N.D.	N.D.	1034	24	63	80
*cinética compleja							

Ejemplo 8**Rastreo Biacore de alta resolución de IL-1 β humana de 6 anticuerpos monoclonales purificados**

Seis Acm purificados (9.5.2, 5.5.1, 8.18.1, 6.20.1, 6.33.1 y 9.19.1) se acoplaron mediante aminas, cada uno sobre la superficie de una celda de flujo diferente de un chip de Biacore CM5 y se probó su afinidad de unión a IL-1 β humana. Todos los Acm se diluyeron en acetato de sodio 10 mM, a pH 4,0 para su inmovilización. El tampón de desplazamiento y el tampón de preparación de la muestra para todos los experimentos fue HBS-P desgasificado que contenía 100 μ g/ml de BSA. Todos los experimentos se desarrollaron a 23 °C con un caudal de 100 μ l/min. Con la excepción del Acm 9.5.2, se inyectaron al azar muestras de IL-1 β de dilución seriada (2 veces) por triplicado durante 90 segundos con varias inyecciones de tampón intercaladas para la doble referenciación. Las condiciones de regeneración y los tiempos de disociación variaban (véase a continuación). Para todos los experimentos de alta resolución se usó un instrumento biosensor Biacore 2000.

Acm 9.5.2:

Se preparó un chip CM5 con Acm 9.5.2 inmovilizado covalentemente usando química de acoplamiento de aminas estándar en las celdas de flujo 1, 2 y 4, sirviendo la celda de flujo 3 como control (los niveles de inmovilización para 9.5.2 sobre las cF 1, 2 y 4 fueron de 1650, 1370 y 652 UR, respectivamente). Se preparó una solución de IL-1 β con una concentración final de 55 pM (250 ml) usando pipetas serológicas de vidrio y material de vidrio volumétrico. Se inyectó IL-1 β a una concentración de 55 pM directamente desde el depósito con bomba de tampón a 100 μ l/min en el ciclo 1 durante 18,1 h, seguido del bombeo de tampón de desplazamiento (HBS-P, 100 μ g/ml de BSA, pH 7,4) para seguir la reacción de disociación durante 24,8 h a través de las cuatro celdas de flujo. Antes del comienzo de la inyección de antígeno, se desarrolló el sensograma durante una hora haciendo fluir tampón de desplazamiento con el fin de establecer un nivel basal anterior a la inyección. Antes del siguiente ciclo se regeneró la superficie con dos pulsos de 35 μ l de ácido fosfórico 146 mM, a pH~1,5.

En el segundo ciclo de Biacore, se hizo fluir tampón de desplazamiento como si estuviera teniendo lugar una inyección real de IL-1 β . Se hizo fluir tampón de desplazamiento a través de todas las superficies durante ~50 horas para simular el curso temporal de las fases de asociación y disociación para IL-1 β realizadas en el ciclo 1 (1 h para la estabilización basal, 18,1 h para la asociación y 24,8 horas para la disociación). Todos los datos se procesaron en el programa Scrubber y se referenciaron doblemente (sólo se disponía de un sensograma blanco, del ciclo 2, para la doble referenciación) y los datos se ajustaron en CLAMP 2000. Cuando se ajustaron los sensogramas de las celdas de flujo 1 y 2 de forma global usando un modelo de interacción 1:1 con un término para el transporte de masa (6,6 X 10⁸ UR*M⁻¹S⁻¹) se obtuvieron los parámetros de unión mostrados en la tabla 16.

Esta metodología Biacore de "asociación y disociación largas" da una K_D para la interacción de IL-1 β /Acm 9.5.2 que es ~7,5 veces menos ajustada que la observada con la tecnología KinExA (véase el ejemplo 9 a continuación). Lo más probable es que esta discrepancia se deba al hecho de que las concentraciones próximas a la verdadera K_D de aproximadamente 200 fM no pueden hacerse fluir a través de la superficie de Acm debido a que no se puede observar ninguna señal a una concentración de IL-1 β tan baja.

Acm 5.5.1:

El Acm 5.5.1 se diluyó a 14 μ g/ml para inmovilizar 762 UR sobre una celda de flujo. El intervalo de concentraciones de IL-1 β de dilución seriada fue de 4,9 - 0,31 nM. Los datos de disociación se registraron a lo largo de 15 minutos. La superficie se regeneró después de cada ciclo con un pulso de 21 segundos de glicina-HCl 10 mM, a pH 2,5, seguido de una inyección de 15 segundos de la misma solución de glicina.

Acm 6.33.1:

El Acm 6.33.1 se diluyó a 7,5 µg/ml para inmovilizar 694 UR sobre una celda de flujo. El intervalo de concentraciones de IL-1β de dilución seriada fue de 29,4 - 0,92 nM. Los datos de disociación se registraron a lo largo de 20 minutos. La superficie se regeneró después de cada ciclo con dos pulsos de 21 segundos de glicina-HCl 10 mM, a pH 2,0.

Acm 9.19.1:

El Acm 9.19.1 se diluyó a 12,6 µg/ml para inmovilizar 977, 763 y 817 UR sobre tres celdas de flujo diferentes, respectivamente. El intervalo de concentraciones de IL-1β fue de 19,6 - 0,61 nM. Los datos de disociación se registraron a lo largo de 15 minutos. Las superficies se regeneraron después de cada ciclo con un pulso de 21 segundos de glicina-HCl 10 mM, a pH 2,0, seguido de una inyección de 6 segundos de ácido fosfórico 146 mM, a pH 1,5.

Acm 6.20.1:

El Acm 6.20.1 se diluyó a 17,6 µg/ml para inmovilizar 907 UR sobre una celda de flujo. El intervalo de concentraciones de IL-1β fue de 29,4 - 0,92 nM. Los datos de disociación se registraron a lo largo de 20 minutos. La superficie se regeneró después de cada ciclo con un pulso de 12 segundos de glicina-HCl 10 mM, a pH 2,0.

Acm 8.18.1:

El Acm 8.18.1 se diluyó a 18,5 µg/ml para inmovilizar 572 UR sobre una celda de flujo. El intervalo de concentraciones de IL-1β fue de 58,7 - 0,92 nM. Los datos de disociación se registraron a lo largo de 20 minutos. La superficie se regeneró después de cada ciclo con un pulso de 12 segundos de glicina-HCl 10 mM, a pH 2,0.

Los datos para los seis Acm se ajustaron de forma global a un modelo de interacción 1:1 con transporte de masa usando CLAMP. Las constantes de unión resultantes se muestran en la tabla 16, a continuación. El asterisco junto a los resultados recogidos para el Acm 6.20.1 indica que estos datos mostraron una cinética compleja.

Tabla 16

Muestra	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
9.5.2	$7,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^{-6}$	1,5
5.5.1	$1,57 \times 10^7$	$7,04 \times 10^{-4}$	44,7
6.33.1	$1,10 \times 10^6$	$2,59 \times 10^{-4}$	236
9.19.1	$7,27 \times 10^5$	$1,90 \times 10^{-4}$	262
6.20.1	$1,24 \times 10^6$ *	$3,63 \times 10^{-4}$ *	293 *
8.18.1	$4,85 \times 10^5$	$1,88 \times 10^{-4}$	388

Ejemplo 9**Análisis de unión de alta resolución mediante KinExA (ensayo de exclusión cinética)****Análisis de unión de alta resolución de IL-1β humana mediante KinExA (ensayo de exclusión cinética) para el Acm 9.5.2 purificado (isotipo IgG4)**

Además de las medidas de Biacore, la K_D de la unión del Acm 9.5.2 (isotipo IgG4) a IL-1β humana se determinó usando la tecnología KinExA. Para este propósito, se utilizó un instrumento KinExA 3000. En primer lugar, se acoplaron 50 mg de perlas de azlactona con IL-1β (~34 µg) en tampón carbonato de sodio 50 mM, a pH 9,0 durante la noche a 4 °C. En segundo lugar, tras la conjugación de la IL-1β con las perlas, se centrifugaron las perlas y se lavaron una vez con tampón de bloqueo (tampón tris 1 M, a pH 8,3, 10 mg/ml de BSA) y se volvieron a centrifugar. Después, se incubaron las perlas en tampón de bloqueo durante de una a dos horas a ~22 °C con el fin de bloquear todos los grupos azlactona reactivos que quedaran presentes en la superficie de las perlas. Tras el bloqueo, se transfirieron las perlas a un vial de perlas para KinExA estándar y se dispusieron en el instrumento.

Valoración controlada por K_D : Se valoraron doce soluciones que contenían una concentración nominal de sitios de unión de Acm de 667 fM con concentraciones crecientes de IL-1β en solución salina tamponada con Hepes, polisorbato 20 al 0,005 % (P-20) y 100 µg/ml de seroalbúmina bovina, BSA, a pH 7,4 (tampón HBS-P). Cada solución tenía un volumen total de 50 ml y se dejó equilibrar durante 8 días a ~22 °C. Las soluciones de valoración se prepararon usando material de vidrio volumétrico y las concentraciones de IL-1β variaban de 99,5 pM a 1,94 fM. El procedimiento instrumental usado para el análisis de estas soluciones consistió en una etapa de

empaquetamiento de perlas en la que se empaquetaron las perlas en un capilar de vidrio y se hicieron fluir las soluciones equilibradas a través de la columna de perlas a 0,25 ml/min durante 80 min (20 ml) por duplicado. Posteriormente, se hizo fluir un anticuerpo policlonal cy-5 de cabra anti-humano (específico de cadena pesada + ligera (H+L)) con marcaje fluorescente a 13,6 nM a través de las perlas empaquetadas durante 2 min a 0,5 ml/min para marcar los sitios de unión de Acm libres capturados en las perlas. La emisión de fluorescencia de las perlas empaquetadas se midió a 670 nm con excitación a 620 nm. Las medidas de fluorescencia resultantes se convirtieron en % de sitios de unión a Acm libres frente a la concentración total de antígeno usando el paquete de programas informáticos de KinExA adjunto (versión 1.0.3). La curva de valoración controlada por K_D resultante se ajustó con el programa informático de KinExA a una isoterma de equilibrio 1:1 con un factor de corrección de flujo incluido. El valor de la K_D del anticuerpo 9.5.2 (IgG4) que se ajustó a los datos de forma óptima fue 40 fM con límites de confianza del 95 % inferior y superior de 4,9 fM y 114 fM, respectivamente.

Valoraciones controladas por Acm: Se realizaron dos valoraciones controladas por Acm de forma similar a la valoración controlada por K_D . Se valoraron doce soluciones que contenían una concentración nominal de sitios de unión de Acm de 5,33 pM (valoración A) y 102 pM (valoración B) con concentraciones crecientes de IL-1 β en tampón HBS-P. Cada solución tenía un volumen total de 2,5 y 50 ml para las valoraciones B y A, respectivamente. Las concentraciones de IL-1 β variaban de 398 pM a 8 fM en ambas valoraciones. Las soluciones se dejaron equilibrar durante ~1 día para la valoración B y ~8 días para la valoración A a temperatura ambiente antes de cuantificar los sitios de unión de Acm libres en cada una de las soluciones en el instrumento KinExA 3000. El procedimiento instrumental usado para el análisis de estas soluciones consistió en una etapa de empaquetamiento de perlas en la que se empaquetaron las perlas en un capilar de vidrio, se hicieron fluir las soluciones equilibradas a través de la columna de perlas a 0,25 ml/min durante 2 min (0,5 ml) para la valoración B y durante 40 min (10 ml) para la valoración A por triplicado, y posteriormente, se hizo fluir un anticuerpo policlonal cy-5 de cabra anti-humano (específico de H+L) con marcaje fluorescente a 3,4 nM (para las valoraciones A y B) a través de las perlas empaquetadas durante 2 min a 0,5 ml/min. La emisión de fluorescencia de las perlas empaquetadas se midió como se describe anteriormente. Las medidas de fluorescencia resultantes se convirtieron en % de sitios de unión de Acm libres frente a la concentración total de antígeno como se describe anteriormente y los datos de valoración controlada por Acm se ajustaron en un análisis de curva triple (ajuste simultáneo de la curva de valoración controlada por K_D y las dos controladas por Acm) a una isoterma de equilibrio 1:1 con corrección de flujo incluida. Los valores ajustados para la K_D y la concentración de sitios de unión de Acm activos del análisis de curva de valoración triple proporcionaron valores de 181 fM (con límites de confianza del 95 % inferior y superior de 60,0 y 341 fM) y 6,33 pM (con límites de confianza del 95 % superior e inferior de 5,36 y 7,47 pM para la valoración A), respectivamente. La K_D , 181 fM, resultante del análisis de curva triple es más precisa que el ajuste de la curva de valoración controlada por K_D sola, ya que proviene del análisis global más riguroso de tres curvas de valoración.

Procedimiento cinético "directo" de KinExA para la determinación de k_{asoc}

Se usó una metodología cinética "directa" con el fin de determinar la constante de velocidad de asociación cinética, k_{asoc} , de la unión de IL-1 β a 9.5.2 (isotipo IgG4). Las perlas de azlactona se prepararon como se describe anteriormente para las valoraciones de equilibrio. Todas las soluciones de IL-1 β y Acm 9.5.2 se prepararon en tampón HBS-P desgasificado. Se mezcló rápidamente una solución de 25 ml que contenía IL-1 β a una concentración inicial de 238,8 pM con una solución de 25 ml de 9.5.2 inicialmente a 200 pM de sitios de unión de Acm para formar una solución de 50 ml con concentraciones finales de IL-1 β y Acm 9.5.2 de 119,4 pM y 99,9 pM de sitios de unión, respectivamente. Para cuantificar el Acm libre en función del tiempo, se hicieron fluir 0,5 ml de la solución final anterior a través de las perlas empaquetadas a un caudal de 0,25 ml/min durante 2 min (1 ml) y después se detectó usando un flujo de 2 min a través de un Acp cy-5 marcado de cabra anti-humano (H+L) con marcaje fluorescente 3,4 nM. El primer punto temporal de la disminución exponencial fue a 464 s y después de eso, se recogió un punto cada 804 s (~13,5 min) a medida que se aproximaba el equilibrio durante más de 1 h. La curva exponencial monofásica resultante se ajustó en el programa informático de KinExA proporcionado (versión 1.0.3) a una función exponencial individual que describe una interacción 1:1. La k_{asoc} resultante = $3,4 \times 10^6$ M⁻¹s⁻¹ con un intervalo de confianza del 95 % de $2,8\text{--}4,0 \times 10^6$ M⁻¹s⁻¹. Multiplicando $k_{asoc} \times K_D$ se calculó la constante de velocidad de disociación, k_{disoc} , como $6,1 \times 10^{-7}$ s⁻¹.

Análisis de unión de alta resolución de IL-1 β humana mediante KinExA (ensayo de exclusión cinética) para el Acm 9.5.2 purificado (isotipo IgG2)

La K_D de la unión del Acm 9.5.2 a IL-1 β humana también se determinó usando la tecnología KinExA, un anticuerpo monoclonal 9.5.2 que se cambió de clase de un isotipo IgG4 a un isotipo IgG2. Los procedimientos para el cambio de clase de anticuerpos se conocen en la técnica y se analizan en el ejemplo 10 a continuación. En primer lugar, se acoplaron 50 mg de perlas de azlactona con IL-1 β (~34 μ g) en tampón carbonato sódico 50 mM, a pH 9,0 durante la noche a 4 °C. En segundo lugar, tras la conjugación de IL-1 β con las perlas, se centrifugaron las perlas y se lavaron una vez con tampón de bloqueo (tampón Tris 1 M, a pH 8,3, 10 mg/ml de BSA) y se volvieron a centrifugar, y después se incubaron en tampón de bloqueo durante de una a dos horas a ~22 °C con el fin de bloquear todos los grupos azlactona reactivos que quedaran presentes en la superficie de las perlas. Tras el bloqueo, se transfirieron las perlas a un vial de perlas para KinExA estándar y se dispusieron en el instrumento.

Valoración controlada por K_D : Se valoraron doce soluciones que contenían una concentración nominal de sitios de

unión de Acm de 680 fM con concentraciones crecientes de IL-1 β en tampón HBS-P. Cada solución tenía un volumen total de 50 ml y se dejó equilibrar durante 8 días a ~22 °C. Las soluciones de valoración se prepararon usando material de vidrio volumétrico y las concentraciones de IL-1 β variaban de 99,5 pM a 1,94 fM. El procedimiento instrumental usado para el análisis de estas soluciones consistió en una etapa de empaquetamiento de perlas en la que se empaquetaron las perlas en un capilar de vidrio y se hicieron fluir las soluciones equilibradas a través de la columna de perlas a 0,25 ml/min durante 80 min (20 ml) por duplicado. Posteriormente, se hizo fluir un anticuerpo policlonal cy-5 de cabra anti-humano (específico de H+L) con marcaje fluorescente a 13,6 nM a través de las perlas empaquetadas durante 2 min a 0,5 ml/min para marcar los sitios de unión de Acm libres capturados en las perlas. La emisión de fluorescencia de las perlas empaquetadas se midió como se describe anteriormente. Las medidas de fluorescencia resultantes se convirtieron en % de sitios de unión a Acm libres frente a la concentración total de antígeno usando el paquete de programas informáticos de KinExA adjunto (versión 1.0.3). La curva de valoración controlada por K_D resultante se ajustó con el programa informático de KinExA a una isoterma de equilibrio 1:1 con un factor de corrección de flujo incluido. El valor de la K_D que se ajustó a los datos de forma óptima fue 41 fM con límites de confianza del 95 % inferior y superior de 11 fM y 83 fM, respectivamente.

Valoraciones controladas por Acm: Se realizaron dos valoraciones controladas por Acm de forma similar a la valoración controlada por K_D . Se valoraron doce soluciones que contenían una concentración nominal de sitios de unión de Acm de 4,98 pM (valoración A) y 102 pM (valoración B) con concentraciones crecientes de IL-1 β en tampón HBS-P. Cada solución tenía un volumen total de 2,5 y 50 ml para las valoraciones B y A, respectivamente. Las concentraciones de IL-1 β variaban de 398 pM a 8 fM en ambas valoraciones. Las soluciones se dejaron equilibrar durante 18 horas para la valoración B y ~8 días para la valoración A a temperatura ambiente antes de cuantificar los sitios de unión de Acm libres en cada una de las soluciones en el instrumento KinExA 3000. El procedimiento instrumental usado para el análisis de estas soluciones consistió en una etapa de empaquetamiento de perlas en la que se empaquetaron las perlas en un capilar de vidrio, se hicieron fluir las soluciones equilibradas a través de la columna de perlas a 0,25 ml/min durante 2 min (0,5 ml) para la valoración B y durante 40 min (10 ml) para la valoración A por triplicado, y posteriormente, se hizo fluir un anticuerpo policlonal cy-5 de cabra anti-humano (específico de H+L) con marcaje fluorescente a 3,4 nM (para las valoraciones A y B) a través de las perlas empaquetadas durante 2 min a 0,5 ml/min. La emisión de fluorescencia se midió como se describe anteriormente. Las medidas de fluorescencia resultantes se convirtieron en % de sitios de unión de Acm libres frente a la concentración total de antígeno como se describe anteriormente y los datos de valoración controlada por Acm se ajustaron en un análisis de curva triple (ajuste simultáneo de la curva de valoración controlada por K_D y las dos controladas por Acm) a una isoterma de equilibrio 1:1 con corrección de flujo incorporada. Los valores ajustados para la K_D y la concentración de sitios de unión de Acm activos del análisis de curva de valoración triple proporcionaron valores de 204 fM (con límites de confianza del 95 % inferior y superior de 83 y 369 fM) y 81.7 pM (con límites de confianza del 95 % superior e inferior de 67,1 y 104 pM para la valoración B). La K_D , 204 fM, resultante del análisis de curva triple es más precisa que el ajuste de la curva de valoración controlada por K_D sola, ya que proviene del análisis global más riguroso de tres curvas de valoración.

Análisis de unión de alta resolución de IL-1 β humana mediante KinExA (ensayo de exclusión cinética) para el Acm 5.5.1 purificado

La K_D de la unión del Acm 5.5.1 a IL-1 β humana se determinó usando la tecnología KinExA. En primer lugar, se acoplaron 50 mg de perlas de azlactona con IL-1 β (~17 μ g) en tampón carbonato sódico 50 mM, a pH 9,0 durante la noche a 4 °C. En segundo lugar, tras la conjugación de IL-1 β con las perlas, se centrifugaron las perlas y se lavaron una vez con tampón de bloqueo (tampón Tris 1 M, a pH 8,3, 10 mg/ml de BSA) y se volvieron a centrifugar, y después se incubaron en tampón de bloqueo durante de una a dos horas a ~22 °C con el fin de bloquear todos los grupos azlactona reactivos que quedaran presentes en la superficie de las perlas. Tras el bloqueo, se transfirieron las perlas a un vial de perlas para KinExA estándar y se dispusieron en el instrumento.

Valoración controlada por K_D : Se valoraron doce soluciones que contenían una concentración nominal de sitios de unión de Acm de 21,3 pM con concentraciones crecientes de IL-1 β en tampón HBS-P. Cada solución tenía un volumen total de 20 ml y se dejó equilibrar durante 1 día a ~23 °C. Las soluciones de valoración se prepararon usando material de vidrio volumétrico y las concentraciones de IL-1 β variaban de 4,97 nM a 97 fM. El procedimiento instrumental usado para el análisis de estas soluciones consistió en una etapa de empaquetamiento de perlas en la que se empaquetaron las perlas en un capilar de vidrio y se hicieron fluir las soluciones equilibradas a través de la columna de perlas a 0,25 ml/min durante 20 min (5 ml) por triplicado. Posteriormente, se hizo fluir un anticuerpo policlonal cy-5 de cabra anti-humano (H+L) con marcaje fluorescente a 3,4 nM a través de las perlas empaquetadas durante 2 min a 0,5 ml/min para marcar los sitios de unión de Acm libres capturados en las perlas. La emisión de fluorescencia de las perlas empaquetadas se midió como se indica anteriormente. Las medidas de fluorescencia resultantes se convirtieron en % de sitios de unión a Acm libres frente a la concentración total de antígeno realizado de forma estándar con el paquete de programas informáticos de KinExA adjunto (versión 1.0.3). La curva de valoración controlada por K_D resultante se ajustó con el programa informático de KinExA a una isoterma de equilibrio 1:1 con un factor de corrección de flujo incluido. El valor de la K_D que se ajustó a los datos de forma óptima fue 19 pM con límites de confianza del 95 % inferior y superior de 16 pM y 23 pM, respectivamente.

Valoración controlada por Acm: La valoración controlada por Acm se realizó de forma similar a la valoración controlada por K_D . Se valoraron doce soluciones que contenían una concentración nominal de sitios de unión de

Acm de 511 pM con concentraciones crecientes de IL-1 β en tampón HBS-P. Cada solución tenía un volumen total de 2 ml. Las concentraciones de IL-1 β variaban de 4,97 nM a 97 fM como en la valoración controlada por K_D . Las soluciones se dejaron equilibrar durante 5 horas antes de cuantificar los sitios de unión de Acm libres en cada una de las soluciones en el instrumento KinExA 3000. El procedimiento instrumental usado para el análisis de estas soluciones consistió en una etapa de empaquetamiento de perlas en la que se empaquetaron las perlas en un capilar de vidrio, se hicieron fluir las soluciones equilibradas a través de la columna de perlas a 0,25 ml/min durante 1 min (0,25 ml), y posteriormente, se hizo fluir un anticuerpo policlonal cy-5 de cabra anti-humano (H+L) con marcaje fluorescente a 3,4 nM a través de las perlas empaquetadas durante 2 min a 0,5 ml/min. La emisión de fluorescencia de las perlas empaquetadas se midió como se describe anteriormente. Las medidas de fluorescencia resultantes se convirtieron en % de sitios de unión de Acm libres frente a la concentración total de antígeno como se describe anteriormente y los datos de valoración controlada por Acm se ajustaron en un análisis de curva doble (ajuste simultáneo de la curva de valoración controlada por K_D y la controlada por Acm) a una isoterma de equilibrio 1:1 con corrección de flujo incluida. Los valores ajustados para la K_D y la concentración de sitios de unión de Acm activos del análisis de curva de valoración doble proporcionaron valores de 20 pM (con límites de confianza del 95 % inferior y superior de 18 y 24 pM) y 13 pM (con límites de confianza del 95 % superior e inferior de 11 y 14 para la curva controlada por K_D), respectivamente. Como siempre, la K_D resultante del análisis de curva doble es más precisa que el ajuste del análisis de curva de valoración controlada por K_D sola.

Análisis de unión de alta resolución de IL-1 β de macaco mediante KinExA (ensayo de exclusión cinética) para el Acm 9.5.2 purificado (isotipo IgG₂)

La K_D de la unión del Acm 9.5.2 a IL-1 β de macaco se determinó usando la tecnología KinExA. En primer lugar, se acoplaron 50 mg de perlas de azlactona con IL-1 β (~17 μ g) en tampón carbonato sódico 50 mM, a pH 9,0 durante la noche a 4 °C. En segundo lugar, tras la conjugación de IL-1 β con las perlas, se centrifugaron las perlas y se lavaron una vez con tampón de bloqueo (tampón Tris 1 M, a pH 8,3, 10 mg/ml de BSA) y se volvieron a centrifugar, y después se incubaron en tampón de bloqueo durante de una a dos horas a ~23 °C con el fin de bloquear todos los grupos azlactona reactivos que quedaran presentes en la superficie de las perlas. Tras el bloqueo, se transfirieron las perlas a un vial de perlas para KinExA estándar y se dispusieron en el instrumento.

Valoración controlada por K_D : Se valoraron doce soluciones que contenían una concentración nominal de sitios de unión de Acm de 4,98 pM con concentraciones crecientes de IL-1 β de macaco en tampón HBS-P. Cada solución tenía un volumen total de 25 ml y se dejó equilibrar durante 3 días a ~23 °C. Las soluciones de valoración se prepararon usando material de vidrio volumétrico y las concentraciones de IL-1 β de macaco variaban de 12,0 nM a 234 fM. El procedimiento instrumental usado para el análisis de estas soluciones consistió en una etapa de empaquetamiento de perlas en la que se empaquetaron las perlas en un capilar de vidrio y se hicieron fluir las soluciones equilibradas a través de la columna de perlas a 0,25 ml/min durante 20 min (5 ml) por triplicado. Posteriormente, se hizo fluir un anticuerpo policlonal cy-5 de cabra anti-humano (específico de H+L) con marcaje fluorescente a 3,4 nM a través de las perlas empaquetadas durante 2 min a 0,5 ml/min para marcar los sitios de unión de Acm libres capturados en las perlas. La emisión de fluorescencia de las perlas empaquetadas se midió como anteriormente. Las medidas de fluorescencia resultantes se convirtieron en % de sitios de unión a Acm libres frente a la concentración total de antígeno con el paquete de programas informáticos de KinExA adjunto (versión 1.0.3). La curva de valoración controlada por K_D resultante se ajustó con el programa informático de KinExA a una isoterma de equilibrio 1:1 con un factor de corrección de flujo incluido. El valor de la K_D que se ajustó a los datos de forma óptima fue 14 pM con límites de confianza del 95 % inferior y superior de 12 pM y 17 pM, respectivamente.

Valoración controlada por Acm: La valoración controlada por Acm se realizó de forma similar a la valoración controlada por K_D . Se valoraron doce soluciones que contenían una concentración nominal de sitios de unión de Acm de 997 pM con concentraciones crecientes de IL-1 β de macaco en tampón HBS-P. Cada solución tenía un volumen total de 1,5 ml. Las concentraciones de IL-1 β de macaco variaban de 98,6 nM a 1,93 pM. Las soluciones se dejaron equilibrar durante 2 horas antes de cuantificar por triplicado los sitios de unión de Acm libres en cada una de las soluciones en el instrumento KinExA 3000. El procedimiento instrumental usado para el análisis de estas soluciones consistió en una etapa de empaquetamiento de perlas en la que se empaquetaron las perlas en un capilar de vidrio, se hicieron fluir las soluciones equilibradas a través de la columna de perlas a 0,25 ml/min durante 1,2 min (0,300 ml) por triplicado, y posteriormente, se hizo fluir un anticuerpo policlonal cy-5 de cabra anti-humano (específico de H+L) con marcaje fluorescente a 1,4 nM a través de las perlas empaquetadas durante 2 min a 0,5 ml/min. La emisión de fluorescencia de las perlas empaquetadas se realizó como se describe anteriormente. Las medidas de fluorescencia resultantes se convirtieron en % de sitios de unión de Acm libres frente a la concentración total de antígeno como se describe anteriormente y los datos de valoración controlada por Acm se ajustaron en un análisis de curva doble (ajuste simultáneo de la curva de valoración controlada por K_D y la controlada por Acm) a una isoterma de equilibrio 1:1 con corrección de flujo incluida. Los valores ajustados para la K_D y la concentración de sitios de unión de Acm activos del análisis de curva de valoración doble proporcionaron valores de 13 pM (con límites de confianza del 95 % inferior y superior de 11 y 16 pM) y 2,00 nM (con límites de confianza del 95 % superior e inferior de 1,8 y 2,2 para la curva controlada por Acm), respectivamente. Como siempre, la K_D resultante del análisis de curva doble es más precisa que el ajuste del análisis de la curva de valoración controlada por K_D sola.

Ejemplo 10**Inhibición de la producción de IL-6 inducida por IL-1 β en fibroblastos pulmonares MRC-5 por 16 clones anti-IL-1 β**

5 Se probó la potencia de los 16 anticuerpos frente a IL-1 β purificados en un ensayo de MRC-5. Además, se probaron versiones IgG1 λ e IgG2 λ del anticuerpo 9.5.2 IgG4 λ . En anticuerpo 9.5.2 IgG4 λ se cambió de clase *in vitro* a IgG1 λ e IgG2 λ usando técnicas de biología molecular de habilidad ordinaria en la técnica. Brevemente, se lisó el hibridoma 9.5.2 y se realizó una RT-PCR usando cebadores oligonucleotídicos para permitir la recuperación de ADNc para las regiones codificantes de VH y V λ completas. Los ADNc de VH y V λ se clonaron molecularmente en un vector plasmídico en el marco de lectura traduccional correcto con genes para Cy1 o Cy2 para VH y C λ para V λ y se secuenciaron para confirmar la identidad con las secuencias originales. Después, se transfectaron los vectores en células de mamíferos para la producción recombinante de anticuerpo de IgG λ intacto. El anticuerpo se purificó a partir de sobrenadante de cultivo tisular mediante cromatografía con proteína A.

15 Se sembraron placas de 96 pocillos de fondo plano con 5000 células MRC-5 por pocillo en 100 μ l de MEM, FBS al 1 %. Las placas se incubaron durante 18-20 horas a 37 °C + 5 % de CO₂ para permitir la adherencia celular. Se retiró el medio de las células y se reemplazó con 100 μ l de inhibidores de IL-1 β o controles de isotipo coincidente (concentraciones finales de 300 nM a 0,00003 nM, valoración 1:3) y 100 μ l de IL-1 β (R&D Systems) (concentración final de 4 pM) en MEM, FBS al 1 %. Las condiciones del ensayo fueron limitantes de antígeno, p. ej., la concentración de IL-1 β excedió la KD del Acm 9.5.2. Los pocillos que contenían IL-1 β sola o no contenían IL- β se incluyeron como controles. Se incubaron las placas adicionalmente a 37 °C + 5 % de CO₂ durante 24 horas. Se recogieron los sobrenadantes y se sometieron a ensayo para analizar los niveles de IL-6 humana mediante ELISA Duoset (R&D Systems). Se calculó el porcentaje de producción de IL-6 en cada pocillo en comparación con los pocillos de control de IL-1 β sola (100 % de producción). Los valores se representaron gráficamente como concentración de inhibidor de IL-1 β frente a porcentaje de inhibición de la producción de IL-6 y se presentan en la FIG. 2A, la FIG. 2B y la tabla 17.

25 Tabla 17

	CE ₅₀ (nM)
KINERET (Anakinra)	0,077 $\pm$ 0,022
9.5.2 IgG4	0,004 $\pm$ 0,000
9.5.2 IgG2	0,004 $\pm$ 0,003
9.5.2 IgG1	0,001 $\pm$ 0,000
5.5.1	0,216 $\pm$ 0,015
8.18.1	0,536 $\pm$ 0,043
6.20.1	0,595 $\pm$ 0,216
6.26.4	0,591 $\pm$ 0,169
6.33.1	1,06 $\pm$ 0,478
8.6.3	1,587 $\pm$ 0,386
9.11.3	2,67 $\pm$ 1,165
9.19.1	2,911 1,586
5.36.3	3,154 $\pm$ 0,289
6.34.1	4,082 $\pm$ 0,181
9.2.1	5,468 $\pm$ 2,981
9.26.3	5,681 $\pm$ 1,558
6.7.2	6,57 $\pm$ 0,436
9.54.2	11,595 $\pm$ 0,813
9.31.3	14,29 $\pm$ 4,964

Ejemplo 11**Inhibición de IL-8 inducida por IL-1 β en sangre completa humana por 9.5.2, 5.5.1 y 8.18.1**

Se realizaron ensayos de sangre completa para evaluar los efectos de los 3 anti-IL-1 β seleccionados en el ensayo de MRC-5 sobre la producción de IL-8 inducida por IL-1 β . Se prepararon valoraciones de anticuerpos anti-IL-1 β y controles de isotipo coincidentes en RPMI-1640, glutamina 2 mM, penicilina-estreptomicina al 1 %, y se transfectaron a placas de 96 pocillos de fondo redondo. Se recogió sangre completa humana en tubos de EDTA, se trató con 20 U/ml de heparina y se transfirió a placas que contenían muestras de prueba y controles. Se preparó una solución de IL-1 β humana (R&D Systems) en RPMI-1640, glutamina 2 mM, penicilina-estreptomicina al 1 %, y se añadió a las placas a una concentración final de 100 pM, que es una condición limitante de antígeno para el Acm 9.5.2. Los pocillos que contenían IL-1 β sola o no contenían IL- β se incluyeron como pocillos de control. Las muestras de prueba de anti-IL-1 β y los controles de isotipo coincidente se encontraban a concentraciones finales de 100 nM a 0,0003 nM (valorado 1:3) en el interior de las placas. Las placas se incubaron durante seis horas a 37 °C + 5 % de CO₂. Las células de sangre completa se lisaron con Triton X-100 al 0,5 % (Sigma) y los lisados se sometieron a ensayo para analizar la producción de IL-8 mediante ELISA DuoSet (R&D Systems).

Se calculó el porcentaje de producción de IL-8 en cada pocillo en comparación con los pocillos de control de IL-1 β sola (100 % de producción). Los valores se representaron gráficamente como concentración de inhibidor de IL-1 β frente a porcentaje de inhibición de IL-8 y se muestran en la FIG. 3 y la tabla 18.

Tabla 18

	CE ₅₀ (nM)
KINERET (Anakinra)	0,984 $\pm$ 0,223
9.5.2 IgG4	0,135 $\pm$ 0,017
9.5.2 IgG2	0,069 $\pm$ 0,003
9.5.2 IgG1	0,106 $\pm$ 0,017
5.5.1	1,667 $\pm$ 0,377
8.18.1	2,289 $\pm$ 0,453

Ejemplo 12**Inhibición de la producción de IL-6 inducida por IL-1 β en ratones por 9.5.2 y 5.5.1**

Para probar la capacidad de los anticuerpos frente a IL-1 β de inhibir la IL-1 β *in vivo*, se usaron anticuerpos frente a IL-1 β para bloquear la producción de IL-6 inducida en ratones por IL-1 β humana. La IL-1 β genera muchas acciones biológicas agudas, incluida la inducción de IL-6. Se usaron de ocho a 10 ratones por grupo. Como se estableció inicialmente en experimentos de curso temporal, la inyección de IL-1 β humana en ratones provocó un rápido aumento de los niveles de IL-6 en suero que alcanzó su máximo 2 horas después de la inyección. Basándose en los resultados de otros experimentos destinados a definir la dosis y la vía de administración de IL-1 β , a los ratones se les inyectaron por vía intraperitoneal 100 ng/ratón de IL-1 β humana. Los niveles de IL-6 se midieron 2 horas después de la administración de IL-1 β usando un kit comercial de ELISA (R&D System). Se realizaron experimentos de respuesta a dosis inyectando anticuerpos frente a IL-1 β (0,01-75 μ g/ratón, IV) al mismo tiempo que la IL-1 β (100 ng/ratón, IP). Los ratones de control recibieron 100 ng/ratón de solución salina antes de recibir la IL-1 β . Después, se comparó el porcentaje de producción de IL-6 en los ratones tratados con el grupo de control (100 % de producción). Los valores se representaron gráficamente como dosis de inhibidor de IL-1 β (pmol/ratón) frente a porcentaje de inhibición de IL-6 y se presentan en la FIG. 4 y la tabla 19. En la FIG. 4, los triángulos verticales son el Ac 9.5.2, los triángulos invertidos con el Ac Ab 5.5.1 y los cuadrados indican KINERET (Anakinra).

Tabla 19

Potencia <i>in vivo</i>	
CE ₅₀ (pmol/ratón)	
Kineret	222 ± 37
5.5.1	51 ± 1
9.5.2 IgG4	5 ± 3
9.5.2 IgG2	8
9.5.2 IgG1	5

Como se muestra, los anticuerpos frente a IL-1 β mostraron una inhibición de IL-6 dependiente de dosis, lo que demuestra que fueron capaces de neutralizar la actividad de IL-1 β *in vivo*.

5 Ejemplo 13

Determinación de clases canónicas de anticuerpos

Chothia, *et al.* han descrito la estructura de los anticuerpos en términos de "clases canónicas" para las regiones hipervariables de cada cadena de inmunoglobulina (Mol Biol. 20 de agosto de 1987; 196(4):901-17). Se analizaron las estructuras atómicas de los fragmentos Fab y VL de una variedad de inmunoglobulinas para determinar la relación entre sus secuencias de aminoácidos y las estructuras tridimensionales de sus sitios de unión a antígeno. Chothia, *et al.* descubrieron que existían relativamente pocos residuos que, a través de su empaquetamiento, enlaces de hidrógeno o la capacidad de adoptar conformaciones ϕ , ψ u omega inusuales, fueran principalmente los responsables de las conformaciones de las cadenas principales de las regiones hipervariables. Se descubrió que estos residuos se encontraban en sitios del interior de las regiones hipervariables y en la estructura de lámina β conservada. Examinando secuencias de inmunoglobulinas de estructura desconocida, Chothia, *et al.* muestran que muchas inmunoglobulinas tienen regiones hipervariables que son de tamaño similar a una de las estructuras conocidas y que, adicionalmente, contenían residuos idénticos en los sitios responsables de la conformación observada.

Su descubrimiento implicaba que estas regiones hipervariables tienen conformaciones próximas a las de las estructuras conocidas. Para cinco de las regiones hipervariables, el repertorio de conformaciones resultó estar limitado a un número relativamente pequeño de clases estructurales independientes. Estas conformaciones de cadena principal de las regiones hipervariables que se producen comúnmente se denominaron "estructuras canónicas". Trabajos adicionales por Chothia, *et al.* (Nature 21-28 de dic. de 1989; 342(6252):877-83) y otros (Martin, *et al.* J Mol Biol. 15 de nov. de 1996; 263(5):800-15) confirmaron que existe un pequeño repertorio de conformaciones de cadena principal para al menos cinco de las seis regiones hipervariables de los anticuerpos.

Las CDR de cada anticuerpo descrito anteriormente se analizaron para determinar su clase canónica. Como se sabe, sólo se han asignado clases canónicas para CDR1 y CDR2 de cadena pesada de anticuerpo, junto con CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de anticuerpo. La tabla siguiente (tabla 20) resume los resultados de los análisis. Los datos de clase canónica están en la forma *HCDR1-HCDR2-LCDR1-LCDR2-LCDR3, en la que "HCDR" se refiere a la CDR de cadena pesada y "LCDR" se refiere a la CDR de cadena ligera. Así, por ejemplo, una clase canónica 1-3-2-1-5 se refiere a un anticuerpo que tiene una HCDR1 que pertenece a la clase canónica 1, una HCDR2 que pertenece a la clase canónica 3, una LCDR1 que pertenece a la clase canónica 2, una LCDR2 que pertenece a la clase canónica 1 y una LCDR3 que pertenece a la clase canónica 5.

Se realizaron asignaciones a una clase canónica en particular cuando existía una identidad del 70 % o más de los aminoácidos del anticuerpo con los aminoácidos definidos para cada clase canónica. Los aminoácidos definidos para cada anticuerpo se pueden encontrar, por ejemplo, en los artículos por Chothia, *et al.* a los que se hace referencia anteriormente. La tabla 20 y la tabla 21 informan de los datos de clase canónica para cada uno de los anticuerpos frente a IL-1 β . Donde la identidad fue de menos del 70 %, la asignación de clase canónica está marcada con un asterisco ("*") para indicar que se realizó la mejor estimación de la clase canónica correcta, basándose en la longitud de cada CDR y la totalidad de los datos. Cuando no existía una clase canónica coincidente con la misma longitud de CDR, la asignación de clase canónica está marcada con una letra s y un número, tal como "s9", que quiere decir que la CDR es de tamaño 9. Las clases canónicas indicadas con 9F, 10A y 10B representan nuevos ejemplos de estructuras de tamaño 9, 10 y 10 respectivamente. Todavía no se ha establecido un número de clase canónica para estos ejemplos de estructuras.

Tabla 20

Anticuerpo (ordenados)	H1-H2-L1-L2-L3	longitud H3
4_20_1	1-3-2-1-1	9
5_36_1	3-s18-4-1-1	16
5_5_1	1-3-6-1-10B*	10
6_20_1	1-2-9-1-9F*	9
6_26_1	3-1-9*-1-9F	14
6_33_1	1-3-6-1-10B*	10
6_34_1	1-2-9-1-9F*	9
6_7_1	1-2-9-1-9F*	9
8_18_1	3-1-9-1-10A*	10
8_50_1	1-1-9-1-5*	13
8_59_1	1-3-8*-1-1	10
8_6_1	3-1-9-1-10A*	10
9_11_1	1-3-6-1-10B*	10
9_19_1	1-3-6-1-10B	12
9_2_1	1-3-6-1-10B	12
9_26_1	1-3-6-1-10B	12
9_31_1	1-3-9-1-5*	13
9_5_2	1-4-9-1-s9	17
9_54_1	1-3-9-1-5*	17

Tabla 21

Anticuerpo	H1-H2-L1-L2-L3 (ordenados)	longitud H3
8_50_1	1-1-9-1-5*	13
6_20_1	1-2-9-1-9F*	9
6_34_1	1-2-9-1-9F*	9
6_7_1	1-2-9-1-9F*	9
4_20_1	1-3-2-1-1	9
9_10_1	1-3-6-1-10B	12
9_2_1	1-3-6-1-10B	12
9_26_1	1-3-6-1-10B	12
5_5_1	1-3-6-1-10B*	10
6_33_1	1-3-6-1-10B*	10
9_11_1	1-3-6-1-10B*	10
8_59_1	1-3-8*-1-1	10
9_54_1	1-3-9-1-5*	17
9_31_1	1-3-9-1-5*	13
9_5_2	1-4-9-1-s9	17
6_26_1	3-1-9*-1-9F	14
8_18_1	3-1-9-1-10A*	10
8_6_1	3-1-9-1-10A*	10
5_36_1	3-s18-4-1-1	16

5 Un candidato, 9.5.2, tiene la clase canónica 1-4-9-1-s9, y no existe ningún otro anticuerpo que comparta la misma estructura. La estructura observada más frecuentemente es 1-3-6-1-10B(*); 6 de cada 21 secuencias tenían esta combinación. La clase canónica L3 en este caso es 10B, lo que quiere decir el ejemplo B de agrupación no clasificada para la longitud de CDR 10.

10 La tabla 22 es un análisis del número de anticuerpos por clase. El número de anticuerpos que tienen la clase canónica en particular indicada en la columna de la izquierda se muestra en la columna de la derecha.

Tabla 22

H1-H2-L1-L2-L3	Recuento
1-1-9-1-5*	1
1-2-9-1-9F*	3
1-3-2-1-1	1
1-3-6-1-10B	3
1-3-6-1-10B*	3
1-3-8*-1-1	1
1-3-9-1-5*	2
1-4-9-1-s9	1
3-1-9*-1-9F	1
3-1-9-1-10A*	2
3-s18-4-1-1	1
Total	19

Ejemplo 14**Un anticuerpo monoclonal totalmente humano de alta afinidad frente a IL-1 β**

- 5 Este ejemplo compara la actividad de anticuerpos descritos en el presente documento frente a Anakinra, un antagonista del receptor de interleucina-1 conocido.

La caracterización del anticuerpo del clon 9.5.2 reveló que el anticuerpo presentaba una alta afinidad ($K_D = 204$ fM para IgG2 y 181 fM para IgG2) por IL-1 β . 9.5.2 era un Acm IgG4 que se cambió de clase a los isotipos IgG2 e IgG1. El epítipo de IL-1 β para este anticuerpo reside en los residuos 1-34 N-terminales de las moléculas de IL-1 β . Arg4 se identificó como un residuo clave para este anticuerpo.

9.5.2 neutralizó de forma potente la IL-1 β *in vitro*, como se demuestra a través de la inhibición de la producción de IL-6 inducida por IL-1 β por células MRC-5 y de la producción de IL-8 por sangre completa (protocolos mostrados en los ejemplos anteriores y los resultados se muestran en la tabla 23 a continuación). En ratones, 9.5.2 inhibió la producción de IL-6 inducida por IL-1 β , como se muestra en la tabla 23. 9.5.2 presentó potencias *in vitro* e *in vivo* superiores a Anakinra (tabla 23). Debido a que la concentración de IL-1 β usada en los ensayos *in vitro* era limitante de antígeno ($[IL-1\beta] > K_D$), la potencia real puede ser mayor. Este ejemplo demuestra que el bloqueo de IL-1 β con un Acm es un enfoque válido para la neutralización de la función de IL-1 y, por tanto, representa un enfoque terapéutico válido para enfermedades inflamatorias.

Tabla 23

	Potencia <i>in vitro</i> (CE ₅₀ pM)		Potencia <i>in vivo</i> (CE ₅₀ pmol/ratón)
	IL-6 (MRC-5)	IL-8 (sangre completa)	IL-6
9.5.2 IgG4	4 $\pm$ 0	135 $\pm$ 17	5 $\pm$ 3
9.5.2 IgG2	4 $\pm$ 3	69 $\pm$ 3	8
9.5.2 IgG1	1 $\pm$ 0	106 $\pm$ 17	5
Anakinra	77 $\pm$ 22	984 $\pm$ 223	222 $\pm$ 37

Ejemplo 15**Determinación de epítipos**

Se caracterizaron diecinueve anticuerpos totalmente humanos de ratones XenoMouse, 9.5.2, 6.33.1, 9.54.2, 6.26.4, 8.50.1, 8.59.2, 9.31.1, 9.2.1, 9.11.3, 5.5.1, 5.36.3, 8.18.1, 8.6.3, 6.20.1, 4.20.2, 6.7.2, 6.34.1, 9.19.1, 9.26.3, para determinar sus epítipos de unión a IL-1 β . Se descubrió que ninguno de los anticuerpos se unía a IL-1 β cuando la IL-1 β estaba unida a un soporte sólido de membrana de PVDF. A partir de esto, se llegó a la conclusión de que los Acm se unen a IL-1 β en solución sólo a través de un epítipo conformacional. El epítipo al que se une un anticuerpo se puede determinar por una variedad de formas. Por ejemplo, se usó espectroscopía de masas SELDI para determinar los epítipos del Acm 9.5.2, el Acm 5.5.1 y el Acm 8.59.2.

Se usó proteína A unida covalentemente a una matriz de chip de proteína PS20 (Ciphergen, Inc.) para capturar los

Acm 9.5.2 y 5.5.1. Los Acm se incubaron con IL-1 β madura purificada marcada con HIS y después se digirió totalmente el complejo de anticuerpo-antígeno con una alta concentración de Asp-N. La masa del producto de digestión de IL-1 β mantenida en el chip a través de la unión al Acm se determinó por SELDI.

- 5 Para los tres anticuerpos, 9.5.2, 5.5.1 y 8.59.2, los resultados de espectroscopía de masas SELDI demostraron la presencia de un fragmento de 4256 D tras la digestión proteolítica sobre el chip del complejo de Acm-IL-1 β . Esto corresponde a la masa de una marca HIS más los aminoácidos 1-34 de IL-1 β . Esto demuestra que cada uno de estos tres anticuerpos se unió al epítipo 1-34 de IL-1 β . En consecuencia, algunas realizaciones de la invención se refieren a anticuerpos que se unen específicamente a los aminoácidos 1-34 de IL-1 β .

Ejemplo 16

10 Determinación de interacción de residuos

Además de determinar el epítipo general al que se une un anticuerpo, se determinaron residuos concretos de IL-1 β que estaban implicados en la formación de una interacción con el IL-1R de tipo 1. Como apreciará el experto en la técnica, la capacidad de dirigirse a residuos o epítopos de IL-1 β que interaccionan con el receptor puede permitir la formación o selección de anticuerpos que se unen a IL-1 β en estos epítopos o residuos y, por tanto, actuar con una capacidad neutralizadora superior.

15 Se obtuvo un modelo estructural de interacción de IL-1 β con el IL-1R de tipo 1 y se presenta en la FIG. 5. Los residuos importantes para la unión de IL-1 β y la señalización a través del IL-1R de tipo I incluyen R4, K16, H30, Q48, E51, K92, K103 y E105. Se ha mostrado anteriormente que Arg4 forma parte del sitio de activación del receptor en IL-1 β , junto con K92, K93 y K94.

- 20 Para estudiar con más detalle cómo se une el anticuerpo a IL-1 β , se prepararon mutantes dirigidos a sitio en residuos clave para la función, p. ej., R4, R11 y H30, del interior de los 1-34 aminoácidos aminoterminales de IL-1 β , que contienen los epítopos de los Acm, como se muestra en el ejemplo 15 anterior. También se mutaron K92, K94, K103 y E105. La anulación de la unión a una forma mutante de IL-1 β (anulación indicada por medio de una "X" en la tabla 24) identifica ese residuo como importante en el epítipo para la unión. En la tabla 24 se identifican una
- 25 diversidad de residuos y combinaciones de los mismos para la unión de anticuerpos neutralizadores frente a IL-1 β . Mediante el uso de estos mutantes dirigidos a sitio, se generó un modelo estructural de la IL-1 β con cada uno de los dos epítopos del Acm 9.5.2 y el Acm 5.5.1. El modelo resultante, que demuestra epítopos independientes pero solapantes, se muestra en la FIG. 6. El mutante H30A mantuvo la unión a ambos anticuerpos, lo que indica que no era esencial para la actividad neutralizadora del Acm. Para el Acm 5.5.1, tanto el mutante R4A como el R11A anularon la unión. Por el contrario, para el Acm 9.5.2, sólo el mutante R4A impidió la unión. Por tanto, 9.5.2 y 5.5.1
- 30 tienen epítopos diferentes parcialmente solapantes, aunque comparten el residuo R4. Esto indica que es probable que R4 sea relevante como residuo neutralizador en los epítopos de los Acm.

Tabla 24

ANTICUERPO	R4	R11	H30	K92	K94	K103	E105
6.20.1	X	X				X	X
8.6.3	X	X					
9.54.2		X	X				
6.7.2	X	X				X	X
5.36.3	X	X				X	X
6.34.1	X	X				X	X
8.18.1	X	X					
6.26.4		X					
9.5.2	X						
8.50.1		X					
9.19.1							
9.26.3							
9.31.1		X					
9.2.1		X					
9.11.3		X					

(continuación)

ANTICUERPO	R4	R11	H30	K92	K94	K103	E105
6.33.1		X					
8.59.2		X					
4.20.2	X	X					
5.5.1	X	X					

Así, los antígenos que se concentran en R4 pueden ser útiles para desarrollar anticuerpos adicionales con características deseables. Análogamente, los antígenos que se concentran en R11 pueden ser útiles para desarrollar anticuerpos adicionales con características deseables. A su vez, los anticuerpos frente a IL-1 β que se unen a través de los residuos clave R4, R11, H30, K103 o E105 solos o en combinación, pueden tener características neutralizadoras útiles. En algunas realizaciones, se contemplan anticuerpos que se unen a estos residuos diversos (p. ej., indicados en la tabla 24), individualmente o en diversas combinaciones.

Ejemplo 17

Producción de MPO inducida por anti-IL-1 β en pulmones de ratones BALB/C

- 10 Se probó la capacidad del anticuerpo anti-IL-1 beta 9.5.2 de inhibir la producción de mieloperoxidasa (MPO) inducida por IL-1 β como una medida indirecta de la infiltración de neutrófilos en los pulmones de ratones BALB/C.

Brevemente, a ratones BALB/C macho de 13 semanas de edad se les administraron 10 mg/kg de anticuerpo 9.5.2 o control de isotipo por vía intravenosa (IV) en el día -1; o 5 mg/kg IV en el día -1 y 5 mg/kg por vía intranasal (IN) en el día 0. Aproximadamente 24 horas después de la administración del día -1 y 2 h después de la administración del día 0, los ratones recibieron 1 mg de IL-1 β humana recombinante por vía intranasal en PBS. Se incluyeron como controles grupos adicionales de ratones que recibieron IL-1 β sola y PBS solo. Después de 3 horas, se recogió y se pesó el pulmón derecho de cada ratón. Se procesaron las muestras y se probaron para analizar la actividad de MPO como se describe por Bai *et al.* (Immunology feb de 2005 114(2):246-254). Se calcularon y representaron gráficamente las unidades promedio de MPO por gramo de pulmón para cada grupo, como se muestra en la FIG. 7.

- 20 Como se muestra en la figura 7, el anticuerpo 9.5.2 proporcionó una reducción sustancial *in vivo* de la actividad MPO en comparación con el control.

Ejemplo 18

Análisis estructural de anticuerpos frente a IL-1 β

- 25 Se secuenciaron las cadenas pesadas variables y las cadenas ligeras variables de los anticuerpos para determinar sus secuencias de ADN. La información de secuencia completa para los anticuerpos anti-IL-1 β se proporciona en el listado de secuencias con secuencias de nucleótidos y aminoácidos para cada combinación de cadenas gamma y kappa. Las secuencias pesadas variables se analizaron para determinar la familia VH, la secuencia de región D y la secuencia de región J. Después, se tradujeron las secuencias para determinar la secuencia de aminoácidos primaria y se compararon con las secuencias VH y de región D y J de línea germinal para evaluar hipermutaciones somáticas.

La tabla 25 es una tabla que compara las regiones de cadena pesada de anticuerpo con la región de cadena pesada de su análogo de línea germinal. La tabla 26 es una tabla que compara las regiones de cadena ligera kappa de anticuerpo con la región de cadena ligera de su análogo de línea germinal.

- 35 Las regiones variables (V) de cadenas de inmunoglobulina están codificadas por varios segmentos de ADN de línea germinal, que están unidos en regiones variables funcionales (V_HDJ_H o V_KJ_K) durante la ontogenia de los linfocitos B. Se estudió en detalle la diversidad molecular y genética de la respuesta de anticuerpos frente a IL-1 β . Estos ensayos revelaron varios puntos específicos para anticuerpos anti-IL-1 β .

Tabla 25. Análisis de cadenas pesadas

Nombre de la cadena	SEQ ID NO:	V	D	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
	78	Línea germinal			QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCAKS	GYTFT SYGIS	WVRQAPG QGLEWMG	WISAYNGNT NYAQKLQG	RVMTTDTSTSTAYME LRSLSRDDTAVYYCAR	YFDY	WGQGTIV TVSS
6.20.1	14	VH1-18	N.A.	JH4B	QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCAKS	GYTLT SYGIS	WVRQAPG QGLEWMG	WISAYSGKT NYEQKLQG	RVIMTTDTSTNVVYME LRSLSRDDTAVYYCAR	DGPRGYF DF	WGQGTIV TVSS
6.34.1	26	"	"	"	QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCAKS	AYTFT SYGIN	WVRQAPG QGLEWMG	WISYSGNT NYAQKLQD	RVIMTADTSTNVVYME LRSLSRDDTAVYYCAR	DGPRGYF DY	WGQGTIV TVSS
6.7.1	30	"	"	"	QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCAKS	AYTLT SYGIN	WVRQAPG QGLEWMG	WISAYSGKT NYEQKLQG	RVMTTDTSTSVVYME LRSLSRDDTAVYYCAR	DGPRGYF DF	WGQGTIV TVSS
	79	Línea germinal			QVQLVESGGGLVK PGSLRLSCAAS	GFTFS DYMS	WVRQAPG KGLEWVS	YISSSGSTI YYADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCA	YSGWYFD L	WGRGTIV TVSS
9.31.1	66	VH3-11	D1-26	JH2	QVQLVESGGGLVK PGSLRLSCAAS	GFTFS DYMS	WVRQAPG KGLEWVS	YIRSSGSTI YYADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	TPYSGRY HWYFDL	WGRGTIV TVSS
	80	Línea germinal			QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAAS	GFTFS SYGMH	WVRQAPG KGLEWVA	VIWYDGSNK YYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	FDY	WGQGTIV TVSS
4.20.1	2	VH3-33	N.A.	JH4B	QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAAS	GFTFS NYGMN	WVRQAPG KGLEWVA	VIWYDGNKK SEADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	DSRSGPF DY	WGQGTIV TVSS
	81	Línea germinal			QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAAS	GFTFS SYGMH	WVRQAPG KGLEWVA	VIWYDGSNK YYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYC	YYYGMDV	WGQGTIV TVSS
9.26.1	58	VH3-33	N.A.	JH6B	QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAAS	GFTFN NYGMH	WVRQAPG KGLECVA	VIWYDGGNK YYADSVKG	RFAISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCTA	VTKLNY YGMDV	WGQGTIV TVSS
	82	Línea germinal			QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAAS	GFTFS SYGMH	WVRQAPG KGLEWVA	VIWYDGSNK YYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	YDILTGY YYYGMDV	WGQGTIV TVSS
9.54.1	70	VH3-33	D3-9	JH6B	QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAAS	GFTFS SFGMH	WVRQAPG KGLEWVA	VIWYDGSNK YYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	DPNYDIL TGYYYG MDV	WGQGTIV TVSS
	83	Línea germinal			QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAAS	GFTFS SYGMH	WVRQAPG KGLEWVA	VIWYDGSNK YYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYC	VTYYGMDV	WGQGTIV TVSS

(continuación)

Nombre de la cadena	SEQ ID NO:	V	D	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
9.19.1	54	VH3-33	D4-17	JH6B	QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAAS	GFTFN NYGMH	WVRQAPG KGLECVA	VIWYDGGNK YYADSVKG	RFISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCTA	VTKLNY YGMDV	WGQGTIV TVSS
9.2.1	62	"	"	"	QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAAS	GFTFN NYGMH	WVRQAPG KGLECVA	VIWYDGGNK YYADSVKG	RFISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCTA	VTLLYY YGMDV	WGQGTIV TVSS
	84	Línea germinal			QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAAS	GFTFS SYGMH	WVRQAPG KGLEWVA	VIWYDGSNK YYADSVKG	RFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	SSSWYF Y	WGQGTIV TVSS
5.5.1	10	VH3-33	D6-13	JH4B	QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAAS	GFTFS SYGMH	WVRQAPG KGLEWVA	VIWYDGGNK YYADSVQ	RFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRPEDTAVYYCAR	ERSSWY FDY	WGQGTIV TVSS
9.11.1	50	"	"	"	QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAAS	GFTFS VYGMH	WVRQAPG KGLEWVA	VIWYDGGNK YYVDSVKG	RFTISRDN SKNTLYLQ LNSLRAEDTAVYYCAR	ERSSWY FDY	WGQGTIV TVSS
	85	Línea germinal			QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAAS	GFTFS SYGMH	WVRQAPG KGLEWVA	VIWYDGSNK YYADSVKG	RFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	SSGWFDY	WGQGTIV TVSS
6.33.1	22	VH3-33	D6-19	JH4B	QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAAS	GFTFS VYGMH	WVRQAPG KGLEWVA	VIWYDGSNK YYADSVKG	RFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	EKSSGMF FDY	WGQGTIV TVSS
8.59.1	42	"	"	"	QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAAS	GFTFS IYGIH	WVRQAPG KGLEWVA	VIWYDGSNE YYADSVKG	RFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	EKSSGWY FDY	WGQGTIV TVSS
	86	Línea germinal			EVQLVESGGGLVQ PGRSLRLSCTAS	GFTFG DYAMS	WVRQAPG KGLEWVG	FIRSKAYGG TTEYAASVK G	RFTISRDDS KSIAYLQ MNSLKTEDTAVYYCTR	EYSSSSY YYGMDV	WGQGTIV TVSS
9.5.2	74	VH3-49	D6-6	JH6B	EVQLVESGGGLVK PGRSLRLSCTGS	GFTFG DYALN	WVRQAPG MGLEWVG	FIRSKAYGG TTEYAASVK G	RFTISRDDS KSIAYLQ MNSLKTEDTAVYYCNR	EVEYCRS SENYCYG MDV	WGQGTIV TVSS
	87	Línea germinal			QLQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVS	GGGIS SSSY WG	WIRQPPG KGLEWIG	SIYSGSTY YNPSLKS	RVTISVDT SKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCA	EYSSSSY GMDV	WGQGTIV TVSS
6.26.1	18	VH4-39	D6-6	JH6B	QLQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVS	GGGIS RSSY WG	WIRQPPG KGLEWVG	NIYYSGSTH YNPSLKS	RVTISVDT SKNQFSLK LSSVTAADTAVFYCAK	GREYISS SGYGMDV	WGQGTIV TVSS

(continuación)

Nombre de la cadena	SEQ ID NO:	V	D	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
	88	Línea germinal			QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVS	GGGIS SYWS	WIRQPAG KGLEWIG	RIYTSNSTN YNPSLKS	RVTSVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCAR	YSSWYFD L	WGRGTLV TVSS
8.50.1	38	VH4-4	D6-13	JH2	QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVS	GGGIS SDIWS	WIRQPAG KGLEWIG	RFYNSGRTN YRPSLKS	RITMSVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCAR	DMYSGRG NWFYDL	WGRGTLV TVSS
	89	Línea germinal			QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVS	GGSVS SGGY WS	WIRQPPG KGLEWIG	YIYSGSTN YNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCAR	YYGMDV	WGQGTIV TVSS
8.18.1	34	VH4-61	N.A.	JH6B	QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVS	GGSVS SGGY WS	WIRQPPG KGLEWIG	YFYSGSPN YNPSLKR	RIAISVDTSKNQFSLR LSSVTAADTAVYYCAR	DPMHYG MDV	WGQGTIV TVSS
8.6.1	46	"	"	"	QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVS	GGSVS SGGY WS	WVRQPPG KGLEWIG	CFYFSESTN YNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCAR	DPMHYG MDV	WGQGTIV TVSS
	90	Línea germinal			QVQLQQSGPGLVK PSQTLSTCAIS	GDSVS SNSAA WN	WIRQSPS RGLEWLG	RTYRQSKWY NDYAVSVKS	RITINPDTSKNQFSLQ LNSVTPEDTAVYYCAR	QQLVYYY YYGMDV	WGQGTIV TVSS
5.36.1	6	VH6-1	D6-13	JH6B	QVQLQQSGPGLVK PSQTLSTCAIS	GGSVS SGGY WS	WIRQSPS RGLEWLG	RTYRQSKWY NDYAVSVKS	RITINPDTSKNQFSLQ LNSVTPEDTAVYYCAR	EEQQLVR YYYYYGM DV	WGQGTIV TVSS

Tabla 26. Análisis de cadenas ligeras

Nombre de la cadena	SEQ ID NO:	V	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
	91	Línea germinal		DIVMTQTPLSLSV TPGQPASISC	KSSQSLHSDG KTYLY	WYQKPGQ PPQLLIY	EVSNRFS	GVPDFRFGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYC	MQSIQLP# T	FGQGTK LEIK
5.36.1	8	A2	JK5	DIVMTQTPLSLSV TPGQPASISC	KSSQSLHSDG RTYLY	WYQKPGQ PPQLLIY	EASVRFS	GVPDFRFGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYC	MQSIQLPR T	FGQGTK LEIK
	92	Línea germinal		EIVLTQSPDFQSV TPKEKVTITC	RASQSIGSSLH	WYQKPDQ SPKLLIK	YASQSFS	GVPSRFGSGSGTDFT LTINSLEAEDAATYYC	HQSSSLPF T	FGPGTK VDIK
4.20.1	4	A26	JK3	EIVLTQSPDFQSV TPKEKVTITC	RASQSIGSSLH	WYQKPDQ SPKLLIK	FASQSFS	GVPSRISGSGSGTDFT LTINSLEAEDAATYYC	HQSSSLPF T	FGPGTK VDIK
	93	Línea germinal		EIVLTQSPGTLISL SPGERATLSC	RASQSVSSSYL A	WYQKPGQ APRLIY	GASSRAT	GIPDRFGSGSGTDFT LTISRLEPEDFAVYC	QQYGSS# T	FGQGTK VEIK
8.59.1	44	A27	JK1	EIVLTQSPGTLISL SPGERATLSC	RASQSISSSL A	CYQKPGQ TPRLIY	GASSWAT	GIPDRFGSRSGTDFT LSISRLEPDFAVCYC	QQYGSSPP T	FGQGTK VEIK
	94	Línea germinal		QSALTQPASVSGS PGQSITISC	TGTSSDVGGYN YVS	WYQHPGK APKIMY	EVSNRPS	GVSNRFGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYC	SSYTSS# #V	FGGKTK LTVL
9.19.1	56	V1-4	JL2	QSALTQPASVSGS PGQSITISC	TGTSSDVGGYN YVS	WYQHPGK APKFMYY	EVSNRPS	GVSNRFGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYC	SSYTSSSI LV	FGGKTK LTVL
9.26.1	60	"	"	QSALTQPASVSGS PGQSITISC	TGTSSDVGGYN YVS	WYQHPGK APKIMY	EVSNRPS	GVSNRFGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYC	SSYTSSSI LV	FGGKTK LTVL
9.2.1	64	"	"	QSALTQPASVSGS PGQSITISC	TGTSSDVGGYN YVS	WYQHPGK APKIMY	EVSNRPS	GVSNRFGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYC	SSYTSSSI LV	FGGKTK LTVL
	95	Línea germinal		QSALTQPASVSGS PGQSITISC	TGTSSDVGSYN LVS	WYQHPGK APKIMY	EGSKRPS	GVSNRFGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYC	CSYAGSS# #V	FGGKTK LTVL
6.33.1	24	V1-7	JL2	QSALTQPASVSGS PGQSITISC	TGTSSDVGSYN LVS	WYQHPGK APKIMY	EVSKRPS	GTSNRFSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYC	CSYAGNSI WV	FGGKTK LTVL
	96	Línea germinal		QSALTQPASVSGS PGQSITISC	TGTSSDVGSYN LVS	WYQHPGK APKIMY	EGSKRPS	GVSNRFGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYC	CSYAGSST WV	FGGKTK LTVL
5.5.1	12	V1-7	JL3	QSALTQPASVSGS PGQSITISC	TGTSSDVGSYN LVS	WYQHPGK APKIMY	EVSKRPS	GTSNRFSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYC	CSYAGSST WV	FGGKTK LTVL

(continuación)

Nombre de la cadena	SEQ ID NO:	V	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
9.11.1	52	"	"	QSALTQPASVSGS SGQSITISC	TGTSSDVGSYN LVS	WYQQHPGK APKLMY	EVSKRPS	GVSNRFGSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYC	CSYAGNSN WV	FGGTK LTVL
	97	Línea germinal		SYELTQPPPSVSVS PGQTASITC	SGDKLGDKYAC	WYQQKPGQ SPVLVIY	QDSKRPS	GIPERFSGSNSGNTAT LTISGTQAMDEADYYC	QAWDSSTV V	FGGTK LTVL
6.20.1	16	V2-1	JL2	SYELTQPPPSVSVS PGQTASFTC	SGDKLGDKYAC	WYQQKPGQ SPVLVIY	QDRKRPS	GIPERFSGSNSGNTAT LTISGTQAMDEADYYC	QAWDSSTV	FGGTK LTVL
6.26.1	20	"	"	SYELTQPPPSVSVS PGQTASITC	SGDKLGDKYAC	WYQQKPGQ SPVLVIF	QDSRRPS	GIPERFSGSNSGNTAT LTISGTQAMDEADYYC	QAWDTSTV I	FGGTK LTVL
6.34.1	28	"	"	SYELTQPPPSVSVS PGQTASITC	SGDKLGDKYAC	WYQQKPGQ SPVLVIY	QDSKRPS	GIPERFSGSNSGNTAT LTISGTQAMDEADYYC	QAWDSSTV V	FGGTK LTVL
6.7.1	32	"	"	SYELTQPPPSVSVS PGQTASITC	SGDKLGDKYAC	WYQQKPGQ SPVLVIY	QDSKRPS	GIPERFSGSNSGNTAT LTISGTQAMDEADYYC	QAWDSSTV V	FGGTK LTVL
8.18.1	36	"	"	SSELTQPPPSVSVF PGQTANFTC	SGDKLGDKFAC	WYQQKPGQ SPVLVIY	RDNKRPS	GIPERFSGSNSGNTAT LTISGTQAMDEADYYC	QAWDSSTV VV	FGGTK LTVL
8.6.1	48	"	"	SFELTQPPPSVSVS PGQTASITC	SGDKLGDKFAC	WYQQKPGQ SPVLVIY	QDTKRPS	GIPERISGNSGNTAT LTISGTQAMDEADYYC	QAWDSSTV VV	FGGTK LTVL
9.5.2	76	"	"	SYELTQPPPSVSVS PGQTASITC	SGDKLGDKFAC	WYQQKPGQ SPVLVIY	QDTKRPS	GIPERFSGSNSGNTAT LTISGTQAMDEADYYC	QAWDSNTV V	FGGTK LTVL
	98	Línea germinal		SSELTQDPAPVSA LGQTVRITC	QGDSLRSYYAS	WYQQKPGQ APVLVIY	GKNNRPS	GIPDRFSGSSSGNTAS LTITGAQAEDEADYYC	NSRDSSGN HLV	FGGTK LTVL
9.54.1	72	V2-13	JL2	SSELTQDPAPVSA LGQTVRITC	QGDLIRTYAS	WYQQKPGQ APVLVIY	GKNDRPS	GIPDRFSGSSSGNTAS LTITGAQAEDEADYYC	DSRDNTVT HLV	FGGTK LTVL
	99	Línea germinal		SYELTQPPPSVSVS PGQTARITC	SGDALPKKYAY	WYQQKSGQ APVLVIY	EDSKRPS	GIPERFSGSSSGTMTAT LTISGAQVEDEADYYC	YSTDSSGN HRV	FGGTK LTVL
8.50.1	40	V2-7	JL2	SYELTQPPPSVSVS PGQTARITC	SGDALPKKYAY	WYQQKSGQ APVLVIY	EDSKRPS	GIPERFSGSSSGTMTAT LTISGAQVEDEADYYC	YSTDSSDN HRV	FGGTK LTVL

(continuación)

Nombre de la cadena	SEQ ID NO:	V	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
	100	Línea germinal		SYELTQPPSVSVS PGQTARITC	SGDALPKKYAY	WYQQKSGQ APVLVIY	EDSKRPS	GIPERFSGSSSGTMAT LTISGAQVEDEADYYC	YSTDSSGN HRV	FGGGTK LTVL
9.31.1	68	V2-7	JL3	SYELTQPPSVSVS PGQTARITC	SGDALPIKYAY	WYQHKSGQ APVLVIY	EDSKRPS	GIPERFSGSSSGTMAT LTISGAQVEDEADYYC	YSTDSSGN HRV	FGGGTK LTVL

Ejemplo 19**Usos de anticuerpos frente a IL-1 β para el tratamiento de trastornos relacionados con IL-1 β**

- 5 A un paciente humano que presenta un trastorno relacionado con IL-1 β se le inyecta una vez a la semana una cantidad eficaz de anticuerpo frente a IL-1 β , tal como 9.5.2. A intervalos periódicos durante el tratamiento, se realiza un seguimiento del paciente para determinar si los síntomas del trastorno relacionado con IL-1 β han remitido. Tras el tratamiento, se descubre que los pacientes sometidos a tratamiento con el anticuerpo frente a IL-1 β tienen reducción de síntomas relativos a trastornos relacionados con IL-1 β , en comparación con pacientes que no están tratados.

Ejemplo 20**Usos de anticuerpos frente a IL-1 β para el tratamiento de artritis**

- 10 A un paciente humano que presenta síntomas de artritis se le inyecta semanalmente una cantidad eficaz de anticuerpo frente a IL-1 β , tal como 9.5.2. A intervalos periódicos durante el tratamiento, se realiza un seguimiento del paciente humano para determinar si la afección artrítica ha remitido. Tras el tratamiento, se descubre que el paciente que recibe el tratamiento con los anticuerpos frente a IL-1 β tiene síntomas reducidos en comparación con pacientes con artritis que no reciben el tratamiento.

Ejemplo 21**Usos de anticuerpos frente a IL-1 β para evitar la osteoporosis**

- 20 A un paciente humano que presenta síntomas de osteoporosis se le inyecta semanalmente una cantidad eficaz de anticuerpo frente a IL-1 β , tal como 9.5.2. A intervalos periódicos durante el tratamiento, se realiza un seguimiento del paciente humano para determinar si la afección de osteoporosis ha remitido. Tras el tratamiento, se descubre que el paciente que recibe el tratamiento con los anticuerpos frente a IL-1 β tiene síntomas reducidos en comparación con pacientes con osteoporosis que no reciben el tratamiento.

Ejemplo 22**Uso de anticuerpos frente a IL-1 β como agente de diagnóstico****Detección de antígeno de IL-1 β en una muestra**

- 25 Se puede usar un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección de antígeno de IL-1 β en una muestra para diagnosticar a pacientes que presentan niveles altos de producción de IL-1 β . En el ensayo, se adsorben pocillos de una placa de microvaloración, tal como una placa de microvaloración de 96 pocillos o una placa de microvaloración de 384 pocillos, durante varias horas con un primer anticuerpo monoclonal totalmente humano dirigido contra IL-1 β . El anticuerpo inmovilizado sirve como anticuerpo de captura para cualquier antígeno que pueda estar presente en una muestra de prueba. Los pocillos se aclaran y se tratan con un agente de bloqueo tal como albúmina o proteína de la leche para evitar la adsorción inespecífica del analito.

- 30 Posteriormente, se tratan los pocillos con una muestra de prueba que se sospecha que contiene el antígeno o con una solución que contiene una cantidad estándar del antígeno. Una muestra de este tipo puede ser, por ejemplo, una muestra de suero de un sujeto que se sospecha que tiene niveles de antígeno en circulación que se consideran diagnóstico de una patología.

- 35 Después de retirar por aclarado la muestra de prueba o el estándar, se tratan los pocillos con un segundo anticuerpo monoclonal totalmente humano frente a IL-1 β que está marcado por conjugación con biotina. También se puede usar un monoclonal de ratón o derivado de otra especie. El anticuerpo frente a IL-1 β marcado sirve como anticuerpo de detección. Después de retirar por aclarado el exceso del segundo anticuerpo, se tratan los pocillos con peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada con avidina y un sustrato cromógeno adecuado. La concentración del antígeno en la muestra de prueba se determina por comparación con una curva estándar desarrollada a partir de las muestras estándar.

Este ensayo ELISA proporciona un ensayo altamente específico y muy sensible para la detección del antígeno de IL-1 β en una muestra de prueba.

45 Determinación de la concentración de antígeno de IL-1 β en pacientes

- 50 Un ELISA sándwich puede cuantificar los niveles de IL-1 β en suero humano. Dos anticuerpos monoclonales totalmente humanos frente a IL-1 β del ELISA sándwich reconocen epítomos diferentes en la molécula de IL-1 β . De forma alternativa, se pueden usar anticuerpos monoclonales de ratón o derivados de otra especie. El ELISA se lleva a cabo como sigue: se recubren 50 μ l de anticuerpo de captura frente a IL-1 β en tampón de recubrimiento (NaHCO₃ 0,1 M, a pH 9,6) a una concentración de 2 μ g/ml en placas de ELISA (Fisher). Tras incubarlas a 4 °C durante la noche, las placas se tratan con 200 μ l de tampón de bloqueo (BSA al 0,5 %, Tween 20 al 0,1 %, tiomersal al 0,01 % en PBS) durante 1 hora a 25 °C. Las placas se lavan (3x) usando Tween 20 al 0,05 % en PBS (tampón de lavado,

TL). Se diluyen sueros normales o de pacientes (Clinomics, Bioreclamation) en tampón de bloqueo que contiene suero humano al 50 %. Las placas se incuban con muestras de suero durante la noche a 4 °C, se lavan con TL y después se incuban con 100 µl/pocillo de anticuerpo de detección frente a IL-1β biotinilado durante 1 hora a 25 °C. Después de lavarlas, las placas se incuban con HRP-estreptavidina durante 15 minutos, se lavan como antes y después se tratan con 100 µl/pocillo de o-fenilendiamina en H₂O₂ (solución de revelado Sigma) para generar color. La reacción se detiene con 50 µl/pocillo de H₂SO₄ (2 M) y se analiza usando un lector de placas de ELISA a 492 nm. La concentración de antígeno de IL-1β en muestras de suero se calcula por comparación con diluciones de antígeno de IL-1β purificado usando un programa de ajuste de curvas de cuatro parámetros.

Equivalentes

- 10 La memoria descriptiva escrita anterior se considera suficiente para permitir que un experto en la técnica ponga en práctica la invención. La descripción y los ejemplos anteriores detallan determinadas realizaciones preferidas de la invención y describen el mejor modo contemplado por los inventores. No obstante, se apreciará que independientemente de lo detallado que aparezca lo anterior en el texto, la invención puede ponerse en práctica de muchas maneras y la invención debería interpretarse de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas y cualquier equivalente de las mismas.

Listado de secuencias

<110> ABGENIX, INC. Green, Larry Faggioni, Raffaella Foord, Orit Klakamp, Scott L. Senaldi, Giorgio Schneider, Amy K.

- 20 <120> ANTICUERPOS FRENTE A INTERLEUCINA-1 BETA

<130> ABGENIX.126VPC

<150> DOCUMENTO US 60/647.643

- 25 <151> 26-01-2005

<150> DOCUMENTO US 60/753.800

<151> 22-12-2005

- 30 <160> 100

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

- 35 <211> 354

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

caggtacaac tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctgggtt caccttcagt aactatggca tgaactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaaataa taaatcagag 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctacaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatagc 300
cgcagtggcc cttttgacta ctggggccag ggtaccctgg tcaccgtctc ctca 354

```

- 40

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

- 45 <213> Homo sapiens

<400> 2

Gln 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 Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Ser Glu 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 Asp Ser Arg Ser Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 3
 <211> 321
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 gaaattgtac tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60
 atcacctgcc gggccagtc gagcattggt agtagcttac actggtacca gcagaaacca 120
 gatcagtcctc caaagctcct catcaagttt gcttccagc ccttctcagg ggtcccctcg 180
 aggatcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240
 gaagatgctg caacgtatta ctgtcatcag agtagtagtt taccattcac tttcggccct 300
 gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 4
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Phe Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Ile Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 5
 <211> 383
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 5

```

caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60
acctgtgcca tctccgggga cagtgtctct agcaacagtg ctgcttgga ctggatcagg 120
cagtcccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtggat 180
aatgattatg cagtatctgt gaaaagtoga ataaccatca acccagacac atccaagaac 240
cagttctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctgtgta ttactgtgca 300
agagaggagc agcagctggg acgatactac tactactacg gtatggacgt ctggggccaa 360
gggaccacgg tcaccgtctc etc 383

```

<210> 6

5 <211> 127

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1      5      10      15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn

```

```

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

```

10

<210> 7

<211> 336

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<400> 7

```

gatattgtga tgaccacagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60
atctcctgca agtctagtca gacctcctg catagtgatg gaaggaccta tttgtattgg 120
tacctgcaga ggccaggcca gcctccacag ctctgatct atgaagcttc ctaccggttc 180
tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agccgggtgg aggtgagga tggtgggatt tattactgca tgcaaagtat acagcttcct 300
cgcaccttcg gccaaggag acgactggag attaaa 336

```

20 <210> 8

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 8

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	Ser	Leu	Leu	His	Ser	20	25	30	
Asp	Gly	Arg	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Pro	35	40	45	
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Glu	Ala	Ser	Tyr	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	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Ser	85	90	95	
Ile	Gln	Leu	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys	100	105	110	

<210> 9

<211> 357

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 9

cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatgggatg atggagataa taaatactat 180
 gcagactccg tgcagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaataga acagcctgag acccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaacgg 300

agcagcagct ggtactttga ctactggggc cagggaaccc tggtcacgt ctctca 357

10 <210> 10

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 10

Gln	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	Ser	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	Asp	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	50	55	60	
Gln	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	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Glu	Arg	Ser	Ser	Ser	Trp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	100	105	110	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										115			

<210> 11

<211> 330

20 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 11

```

cagtctgcc tgaactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
tcctgcaactg gaaccagcag tgatgttggg agttataacc ttgtctcctg gtaccaacag 120
caccagggca aagcccccaa actcatgatt tatgagggtca gtaagcggcc ctcagggatt 180
tctaactcgtc tctctggctc caagtctggc aacacggcct cctgacaat ctctgggctc 240
caggctgagg acgaggctga ttattactgc tgctcatatg caggtagtag cacttgggtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

```

<210> 12
 <211> 110
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

```

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

```

10 <210> 13
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <400> 13

```

caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggct 60
tcctgcaagg cttctgggta caccttaacc agctatggta tcagttgggt gcgacaggcc 120
cctggacagg ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acagtggtaa aacaaactat 180
gaacagaagc tccagggcag agtcatcatg accacagaca catccacgaa tgtagtctac 240
atggaactga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatggg 300
ccgaggggct actttgactt ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

```

20 <210> 14
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

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

<210> 15
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 15

tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccagcttc 60
 acctgctctg gagataaatt gggggataaa tatgcttgct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcccttg tgctgggtcat ctatcaagat aggaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
 gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg gacagtagca ctgtgggttt cggcggaggg 300
 accaagctga ccgtccta 318

<210> 16
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Phe Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30
 Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

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

<210> 17
 <211> 371
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 17

```

cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcaactg tctctggtgg ctccatcagc agaagtagtt actactgggg ctggatccgc 120
cagcccccag ggaaggggct ggagtggatg gggaatatct attatagtgg gagcaccac 180
tacaaccggt cctcaagag tcgtgtcacc atatccgtgg acacgtccaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgagctctgt gaccgcccga gacacggctg tgttttactg tgcgaaaggt 300
cgggagtata tcagctcgtc cgggtacggg atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct c 371

```

5 <210> 18
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 18

```

Gln 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
Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35      40      45
Trp Met Gly Asn 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 Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Phe Tyr
85      90      95
Cys Ala Lys Gly Arg Glu Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Tyr Gly Met Asp
100      105      110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115      120

```

15 <210> 19
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 19

```

tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccagcatc 60
acctgctctg gagataaatt ggggaataaa tatgtttgct ggtatcagca gaagccaggc 120
cagtcccttg tgttggtcat ctttcaagat agcaggcggc cctcagggat ccctgagcga 180
ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg gacaccagca ctgtgatatt cggcggaggg 300
accaagctga ccgtccta 318

```

20 <210> 20
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 20

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

<210> 21
 <211> 357
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 21

caggtgcagc	tggtggagtc	tgggggagggc	gtgggtccagc	ctggggaggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cgtctggatt	caccttcagt	gtctatggca	tgcaactgggt	ccgccagggt	120
ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtggcagtt	atatggtatg	atggaagtaa	taaatactat	180
gcagactccg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaata	acagcctgag	agccgaggac	acggctgtgt	attactgtgc	gagagagaag	300
agcagtggct	ggttctttga	ctactggggc	caggaaccc	tggtcacctg	ctcctca	357

<210> 22
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22

Gln	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	Val	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	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	Lys	Ser	Ser	Gly	Trp	Phe	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100				105					110			
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115												

<210> 23
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 23

ES 2 395 953 T3

```

cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
tcttgcaactg gaaccagcag tgatgttggg agttataacc ttgtctcctg gtaccaacaa 120
caccagggca aagcccccaa actcatgatt tatgagggtca gtaagcggcc ttcaggaatt 180
tctaatacgt tctctggctc caagtctggc aacacggcct cctgacaat ctctgggctc 240
caggctgagg acgaggctga ttattactgc tgctcatatg caggtaatag catttgggta 300
ttcggcggcg ggaccaagct gaccgtccta 330

```

<210> 24
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

```

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

```

<210> 25
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 25

```

cagggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctgggggcctc agtgaagggtc 60
tcttgcaagg cttctgctta cacctttacc agctatggta tcaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag gacttgagtg gatgggatgg atcagcgggt acagtggtaa cacaaactac 180
gcacagaagc tccaggacag agtcaccatg accgcagaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtat attactgtgc gagagatggg 300
ccgaggggct actttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

```

<210> 26
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

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

Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Pro Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 27
 <211> 318
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 tctatgagc tgactcagcc accctcagt tccgtgtccc caggacagac agccagcatc 60
 acctgctctg gagataaatt gggggataaa tatgcttgct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtcccttg tgctgggtcat ctatcaagat agcaagcggc cctcagggat cctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
 gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg gacagcagca ctgtggtatt cggcggaggg 300
 accaagctga ccgtccta 318

<210> 28
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30
 Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Val Val
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 29
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 29

```

caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggctc 60
tcctgcaagg cttctgggta caccttaacc agctatggta tcagttgggt ggcacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acagtggtaa aacaaactat 180
gaacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag tgtagtctac 240
atggaactga ggagcctgag atctgacgac acggccgtat attactgtgc gagagatggg 300
ccgaggggct actttgactt ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

```

<210> 30

<211> 118

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

```

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

```

10

<210> 31

<211> 318

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15

<400> 31

```

tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccagcadc 60
acctgctctg gagataaatt gggggataaa tatgcttgct ggtatcagca gaagccaggc 120
cagtcacctg tgctgggtcat ctatcaagat agcaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg gacagcagca ctgtggtttt cggcggaggg 300
accaagctga ccgtccta 318

```

<210> 32

20 <211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

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

<210> 33
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 33

~~caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60~~
 acctgcactg tctctggtgg ctccgtcagc agtgggtggtt actactggag ctggatccgg 120
 cagccccag ggaagggact ggagtggatt ggatatttct attacagtgg gagccccaac 180
 tacaaccct cctcaagag gcgaatcgcc atatcagtag acacgtccaa gaaccagttc 240
 tccttgaggc tgagctctgt gaccgctgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagat 300
 cctatgcact actacggtat ggacgtcttg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 34
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34

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

<210> 35
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 35

```

tcctctgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgttcc caggacagac agccaacatc 60
acctgctctg gagataaatt gggggataaa tttgcttgct ggtatcagca gaagccaggc 120
cagtccccctg tgctggtcat ctatcgagat aacaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg gacagcagca cttatgtggt tttcggcgga 300
gggaccaagc tgaccgtcct a 321

```

<210> 36

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

```

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

```

```

65      70      75      80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Tyr Val
      85      90      95
Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100      105

```

10

<210> 37

<211> 362

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15

<400> 37

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgggtg ctccatcagt agtgactact ggagctggat ccggcagccc 120
gccgggaagg gactggagtg gattggccgt ttctataata gtgggaggac caactacaga 180
ccctccctca agagtogaat caccatgtca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt actgtgccag agacatgtat 300
agcggcagag gaaactggta cttcgatctc tggggccgtg gcaccctggt cactgtctcc 360
tc 362

```

<210> 38

<211> 120

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

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

<210> 39
 <211> 324
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 tcctatgagc tgacacagcc accctcggtg tcagtgtccc caggacaaac ggccaggatc 60
 acctgctctg gagatgcatt gccaaaaaaa tatgcttatt ggtaccagca gaagtcaggc 120
 caggcccttg tgctggatcat ctatgaggac agcaaacgac cctccgggat ccctgagaga 180
 ttctctggct ccagctcagg gacaatggcc accttgacta tcagtggggc ccaggtggag 240
 gatgaagctg actactactg ttactcaaca gacagcagtg ataatcatag ggtattcggc 300
 ggagggacca agctgaccgt ccta 324

10 <210> 40
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 40

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

20 <210> 41
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 41

```

caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt cacttcagtc atctatggca ttacttgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatgggatg atggaagtaa tgaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagaag 300
agcagtggct ggtactttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

```

<210> 42
 <211> 119
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42

```

Gln 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 Ile Tyr
 20          25          30
Gly Ile 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 Glu 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 Lys Ser Ser Gly Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100          105          110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```

10 <210> 43
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <400> 43

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtattagc agcagctgct tagcctgtta ccagcagaaa 120
cctggccaga ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gctgggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtcg gtctgggaca gacttcactc tctccatcag cagactggag 240
cctgacgatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gttcaccccc gacgttcggc 300
caagggacca aggtggaaat caaa 324

```

20 <210> 44
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44

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

<210> 45
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 45
 cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccgtcagc agtgggtggtt actactggag ctgggtcccg 120
 cagcccccag ggaagggact ggagtggatt ggggtgtatct atttttagtga gagcaccaac 180
 tacaaccctt cctcaagag tcgagtcacc atatcagtag acacgtccaa gaaccagttc 240
 tcctgaagc tgagctctgt gaccgctgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagat 300
 cctatgcact actacggtat ggacgtcttg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 46
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 46
 Gln 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 Val Ser Ser Gly
 20 25 30
 Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Cys Ile Tyr Phe Ser Glu Ser Thr Asn 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 Asp Pro Met His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln~~
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 47
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 47

ES 2 395 953 T3

```

tcctttgaac tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccagcatt 60
acctgctctg gagataaatt gggggataaa tttgcttgct ggtatcagca gaagccaggc 120
cagtcccctg tgctgggtcat ctatcaagat accaagcggc cctcagggat cctgagcga 180
atctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
gatgaggtg actattactg tcaggcgtgg gacagtagca cttatgtggt ttccggcgga 300
gggaccaagc tgaccgtcct a 321

```

<210> 48
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48

```

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

```

<210> 49
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 49

```

cagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccctcagt gtttatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaaataa taaatactat 180
gtagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240
ctgcaactga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagaga 300
agcagcagct ggtactttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctccctca 357

```

<210> 50
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 50

Gln	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	Val	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	Asn	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	Leu	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Arg	Glu	Arg	Ser	Ser	Ser	Trp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115												

<210> 51
 <211> 330
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 51

cagtctgccc	tgactcagcc	tgccctccgtg	tctgggtctt	ctggacagtc	gatcaccatc	60
tcctgcactg	gaaccagcag	tgatgttggg	agttataaacc	ttgtctcctg	gtaccaacag	120
cacccaggca	aagcccccaa	actcatgatt	tatgagggtca	gtaagcggcc	ctcaggggtt	180
tctaatacgt	tctctggctc	caagtctggc	aacacggcct	ccctgacaat	ctctgggctc	240
caggctgagg	acgaggctga	ttattactgc	tgctcatatg	caggtaatat	caactgggtg	300
ttcggcggag	ggaccaaact	gaccgtccta				330

10 <210> 52
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 52

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

20 <210> 53
 <211> 362
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 53

cagggtgcagc tgggtggagtc tggggggagggc gtgggtccagc ctgggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcaat aactatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg cgtggcagtt atatggtatg atggaggtaa taaatattat 180
~~gcagaetccg tgaagggccg attcgecatc tccagagaca attccaagaa cagcgtgtat 240~~
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtac tgcgggtgact 300
aaactcaact actactacgg tatggacgtc tggggccaac ggaccacggt caccgtctcc 360
tc 362

<210> 54
<211> 120
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54
Gln 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 Asn Asn Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Cys Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Gly Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Ala 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
Thr Ala Val Thr Lys Leu Asn Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
100 105 110
Gln Arg Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

10 <210> 55
<211> 330
<212> ADN
<213> Homo sapiens

15 <400> 55
cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
tcctgcactg gaaccagcag tgacgttggt gggtataact atgtctcctg gtaccaacag 120
caccagggca aagcccccaa attcatgatt tatgagggtca gtaatcggcc ctcaggggtt 180
tctaatacgt tctctggctc caagtctggc aacacggcct cctgacatc ctctgggctc 240
caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caagcagcag tattctggta 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 56
<211> 110
20 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56

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

Ser Ile Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 57
 <211> 362
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 57

caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcaat aactatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg cgtggcagtt atatggtatg atggaggtaa taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcgccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtac tgcggtgacg 300
 aaacttaact actactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 362
 tc

<210> 58
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 58

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

<210> 59
 <211> 330
 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 59

```

cagtcctgcc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
tcctgcactg gaaccagcag tgacgttggt ggttataact atgtctcctg gtaccaacag 120
caccagggca aagcccccaa actcatgatt tatgaggtca gtaatcggcc ctcaggggtt 180
tctaategct tctctggctc caagtctggc aacacggcct cctgaccat ctcctgggctc 240
caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caagcagcag tattctgggt 300
ttcggcgagg ggaccaagct gaccgtccta                                     330

```

5

<210> 60

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 60

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

<210> 61

15

<211> 362

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 61

```

cagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccitcaat aactatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg cgtggcagtt atatggtatg atggaggtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcgccatc tccagagaca attccaagaa cacgttgat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtac tgcggtgact 300
acctctact actactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tc                                     362

```

20

<210> 62

<211> 120

<212> PRT

25

<213> Homo sapiens

<400> 62

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

<210> 63
 <211> 330
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 63

cagtcctgcc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60

tcttgcaactg gaaccagcag tgacgttggt ggttataact atgtctcctg gtaccaacag 120
~~caccagggca aagcccccaa actcatgatt tatgagggtca gtaatcggcc ctcaggggtt 180~~
 tctaactgct tctctggctc caagtctggc aacacggcct cctgaccat ctcctgggctc 240
 caggtgagg acgaggctga ttattactgc agtcatata caagcagcag tattctggta 300
 ttcggcggag ggaccaagct gacgcctctg 330

10 <210> 64
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 64

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

<210> 65
 20 <211> 365
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 65

```
caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttgggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagaagta gtggtagtac catatactac 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctcactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gaggaccccc 300
tatagtggga ggtaccactg gtacttcgat ctctggggcc gtggcaccct ggtcactgtc 360
tcctc
```

5 <210> 66
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 66

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

```
100 105 110
Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120
```

15 <210> 67
<211> 324
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 67

```
tcctatgagc tgacacagcc accctcggtg tcagtgtccc caggacaaac ggccaggatc 60
acctgctctg gagatgcatt gccaataaaa tatgcttatt ggtaccagca taagtcaggc 120
caggcccttg tgctggatcat ctatgaggac agcaaagac cctccgggat cctgagaga 180
ttctctggct ccagctcagg gacaatggcc accttgacta tcagtggggc ccaggtggag 240
gatgaagctg actactactg ttactcaaca gacagcagtg gtaatcatag ggtgttcggc 300
ggagggaacca agctgaccgt ccta 324
```

20 <210> 68
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <400> 68

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

<210> 69
 <211> 377
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 69
 caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
 tctctgtcag cgtctggatt caccttcagt agctttggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatgggatg atggaagtaa taaatattat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaccca 300
 aattacgata ttttgactgg ttactactac tacggcatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
 acggtcaccg tctcctc 377

<210> 70
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 70

Gln 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 Ser Phe
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 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 Asp	Pro Asn Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly		
100	105	110	
Met Asp Val	Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser		
115	120	125	

<210> 71
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 71

```
tcttctgagc tgactcagga ccctgctgtg totgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60
acatgccaaag gagacatcct cagaacctat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120
caggcccttg tacttgtcat ctatggtaaa aacgaccggc cctcagggat ccagaccga 180
ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tcttgacca tcaactggggc tcaggcggaa 240
gatgaggctg actattactg tgactcccg gacaacactg ttacccatct ggtattcggc 300
ggagggacca agctgaccgt ccta                                     324
```

5 <210> 72
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 72

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

15 <210> 73
<211> 383
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 73

```
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc cagggcggtc cctgagactc 60
tcctgtacag gttctggatt cacctttggt gattatgctt tgaactgggt ccgccaggct 120
ccagggatgg ggctggagtg ggtaggtttc attagaggca aagcttatgg tgggacaaca 180

gaatacgccg cgtctgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc caaaagcatc 240
gcctatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaataga 300
gaggtagagt attgcaggtc gtccgagaac tactgctacg gtatggacgt ctggggccaa 360
gggaccacgg tcaccgtctc ctc                                     383
```

20 <210> 74
<211> 127
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <400> 74

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

<210> 75
 <211> 318
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 75
 tcctatgagt tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccagcatc 60
 acctgctctg gagataaatt gggggataaa tttgcttgct ggtatcagca gaagccaggc 120
 cagtccctctg tgctgggtcat ctatcaagat accaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
 gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg gacagcaaca ctgtggtatt cggcggaggg 300
 accaagctga ccgtccta 318

10 <210> 76
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 76
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Phe Ala
 20 25 30
 Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Asn Thr Val Val
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

20 <210> 77
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 77

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

5 <210> 78
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 78

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

<210> 79
 <211> 116
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 79

ES 2 395 953 T3

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

<210> 80

<211> 112

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Gln	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	Ser	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	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	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
			100					105					110		

10

<210> 81

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 81

```

Gln 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 Ser 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 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
Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100      105      110
Ser Ser

```

<210> 82
 <211> 123
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 82

```

Gln 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 Ser 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 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 Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
100      105      110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115      120

```

<210> 83
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 83

```

Gln 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 Ser 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 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
Val Thr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
          100          105          110
Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 84
 <211> 117
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 84

```

Gln 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 Ser 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 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 Ser Ser Ser Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
          100          105          110
Val Thr Val Ser Ser
          115

```

10 <210> 85
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 85

ES 2 395 953 T3

Gln	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	Ser	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	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	Ser	Ser	Gly	Trp	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
			100					105						110	
Thr	Val	Ser	Ser												
			115												

<210> 86
 <211> 124
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 86

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

<210> 87
 <211> 120
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 87

ES 2 395 953 T3

```

Gln Leu 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 Ser
20      25      30
Ser 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 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 Glu Tyr Ser Ser Ser Ser Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100      105      110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115      120

```

<210> 88
 <211> 116
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 88

```

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

```

10 <210> 89
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 89

```

Gln 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 Val Ser Ser Gly
20      25      30
Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35      40      45

```

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn 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 Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 90
<211> 125
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 90

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

10 <210> 91
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 91

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 Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr 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
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
Ile Gln Leu Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

20 <210> 92
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 92

```

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

```

5 <210> 93
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 93

```

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 Ser
          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 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 Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Tyr Gly Ser Ser Thr
          85          90          95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105

```

15 <210> 94
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 94

```

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

```

<210> 95

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 95

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

10 <210> 96

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 96

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

<210> 97

<211> 106

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

```

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

65           70           75           80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Val Val
      85           90           95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
      100           105

```

<210> 98
 <211> 108
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 98

```

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

```

10 <210> 99
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 99

```

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

```

ES 2 395 953 T3

<210> 100
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 100

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

REIVINDICACIONES

1. Un agente de unión dirigido que neutraliza la actividad de la interleucina-1 β (IL-1 β) en el que el agente de unión dirigido comprende:
 - una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 74; y
 - una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 76.
2. El agente de unión dirigido de la reivindicación 1, en el que el agente de unión dirigido es un anticuerpo que comprende un polipéptido de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 76.
3. El agente de unión dirigido de la reivindicación 1, en el que el agente de unión dirigido es un anticuerpo que comprende un polipéptido de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 74.
4. El agente de unión dirigido de la reivindicación 1, en el que dicho agente de unión dirigido se une a y neutraliza la IL-1 β con una KD de 300 fM o menos.
5. El agente de unión dirigido de la reivindicación 1, en el que dicho agente de unión dirigido comprende un anticuerpo que tiene un isotipo IgG2.
6. El agente de unión dirigido de la reivindicación 1, en el que dicho agente de unión dirigido comprende un anticuerpo monoclonal neutralizador totalmente humano.
7. Un polinucleótido aislado que codifica:
 - un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo, en el que dicho dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 74; y
 - un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo, en el que dicho dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 76.
8. Un vector que comprende el polinucleótido aislado de la reivindicación 7.
9. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 8.
10. Uso del agente de unión dirigido de las reivindicaciones 1 a 6 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno relacionado con IL-1 β , que se selecciona del grupo que consiste en trastornos inflamatorios tales como artritis, preferentemente artritis reumatoide o artritis reumatoide juvenil, espondilitis anquilosante, enfermedad de Still, enfermedad de Behcet; enfermedades alérgicas, tales como asma, fiebre del heno y urticaria; enfermedades provocadas por inmunocomplejos, tales como lupus sistémico eritematoso, glomerulonefritis, pénfigo; vasculitis, tal como granulomatosis de Wegener y síndrome de Kawasaki; trastornos del tejido conectivo; enfermedades inflamatorias intestinales, tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa; diabetes insulino dependiente; esclerosis múltiple; psoriasis; uveítis; retinitis; rechazo de injertos; enfermedad de injerto contra huésped; trastornos inflamatorios sistémicos, tales como sepsis o fiebre mediterránea familiar y el síndrome de Muckle-Wells; inflamación tisular en afecciones infecciosas, isquémicas, hemorrágicas y traumáticas, tales como fascitis, apoplejía, infarto de miocardio y otros órganos; SDR; hepatitis, incluida hepatitis infecciosa y no infecciosa, aguda y crónica; pancreatitis aguda y crónica; lesiones por reperfusión; lesiones por radiación; reestenosis vascular de diferentes tipos, tal como reestenosis coronaria; lesiones ortopédicas y dentales tales como distensión muscular, esguince de ligamentos y enfermedad periodontal; caquexia, síndrome de fatiga crónica, anorexia; alteraciones mentales y del sueño, tales como dificultad para el aprendizaje; osteoartritis; osteoporosis; aterosclerosis; fibrosis de órganos, tal como fibrosis pulmonar y hepática; enfermedad de Alzheimer; síndromes parkinsonianos; esclerosis lateral amiotrófica; miopatías; hiperalgesia; dolor relacionado con el cáncer; insuficiencia cardíaca congestiva; cáncer; neoplasias hematológicas, tales como leucemias y mielomas múltiples; desarrollo de tumores sólidos; crecimiento tumoral; y diseminación metastásica.
11. Un agente de unión dirigido de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con IL-1 β , que se selecciona del grupo que consiste en trastornos inflamatorios tales como artritis, preferentemente artritis reumatoide o artritis reumatoide juvenil, espondilitis anquilosante, enfermedad de Still, enfermedad de Behcet; enfermedades alérgicas, tales como asma, fiebre del heno y urticaria; enfermedades provocadas por inmunocomplejos, tales como lupus sistémico eritematoso, glomerulonefritis, pénfigo; vasculitis, tal como granulomatosis de Wegener y síndrome de Kawasaki; trastornos del tejido conectivo; enfermedades inflamatorias intestinales, tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa; diabetes insulino dependiente; esclerosis múltiple; psoriasis; uveítis; retinitis; rechazo de injertos; enfermedad de injerto contra huésped; trastornos inflamatorios sistémicos, tales como sepsis o fiebre mediterránea familiar y el síndrome de Muckle-Wells; inflamación tisular en afecciones infecciosas, isquémicas, hemorrágicas y traumáticas, tales como fascitis, apoplejía, infarto de miocardio y otros órganos; SDR; hepatitis, incluida hepatitis infecciosa y no infecciosa, aguda y crónica; pancreatitis aguda y crónica; lesiones por reperfusión; lesiones por radiación; reestenosis vascular de diferentes tipos, tal como

- 5 reestenosis coronaria; lesiones ortopédicas y dentales tales como distensión muscular, esguince de ligamentos y enfermedad periodontal; caquexia, síndrome de fatiga crónica, anorexia; alteraciones mentales y del sueño, tales como dificultad para el aprendizaje; osteoartritis; osteoporosis; aterosclerosis; fibrosis de órganos, tal como fibrosis pulmonar y hepática); enfermedad de Alzheimer; síndromes parkinsonianos; esclerosis lateral amiotrófica; miopatías; hiperalgesia; dolor relacionado con el cáncer; insuficiencia cardíaca congestiva; cáncer; neoplasias hematológicas, tales como leucemias y mielomas múltiples; desarrollo de tumores sólidos; crecimiento tumoral; y diseminación metastásica.

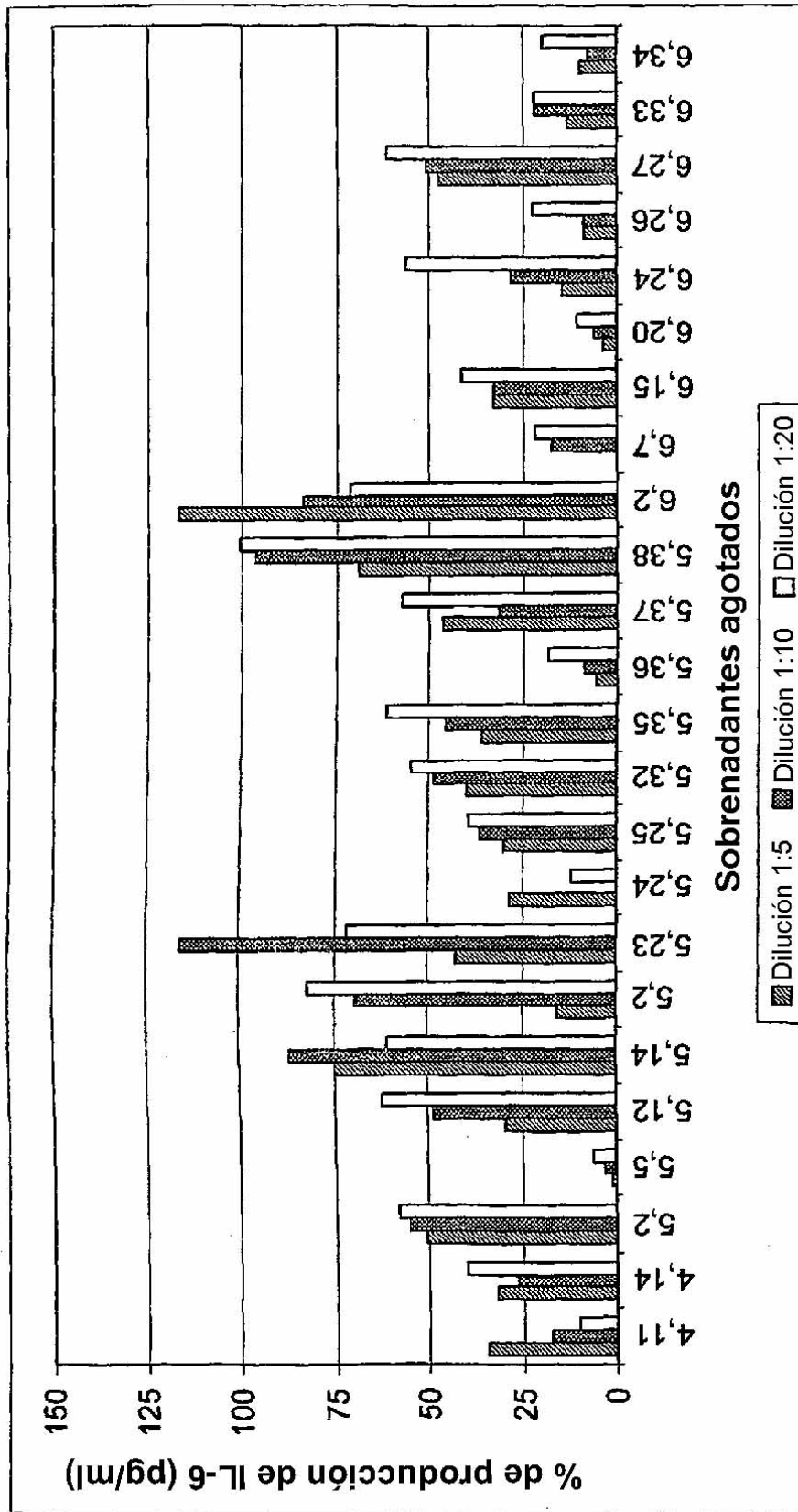


FIG. 1A

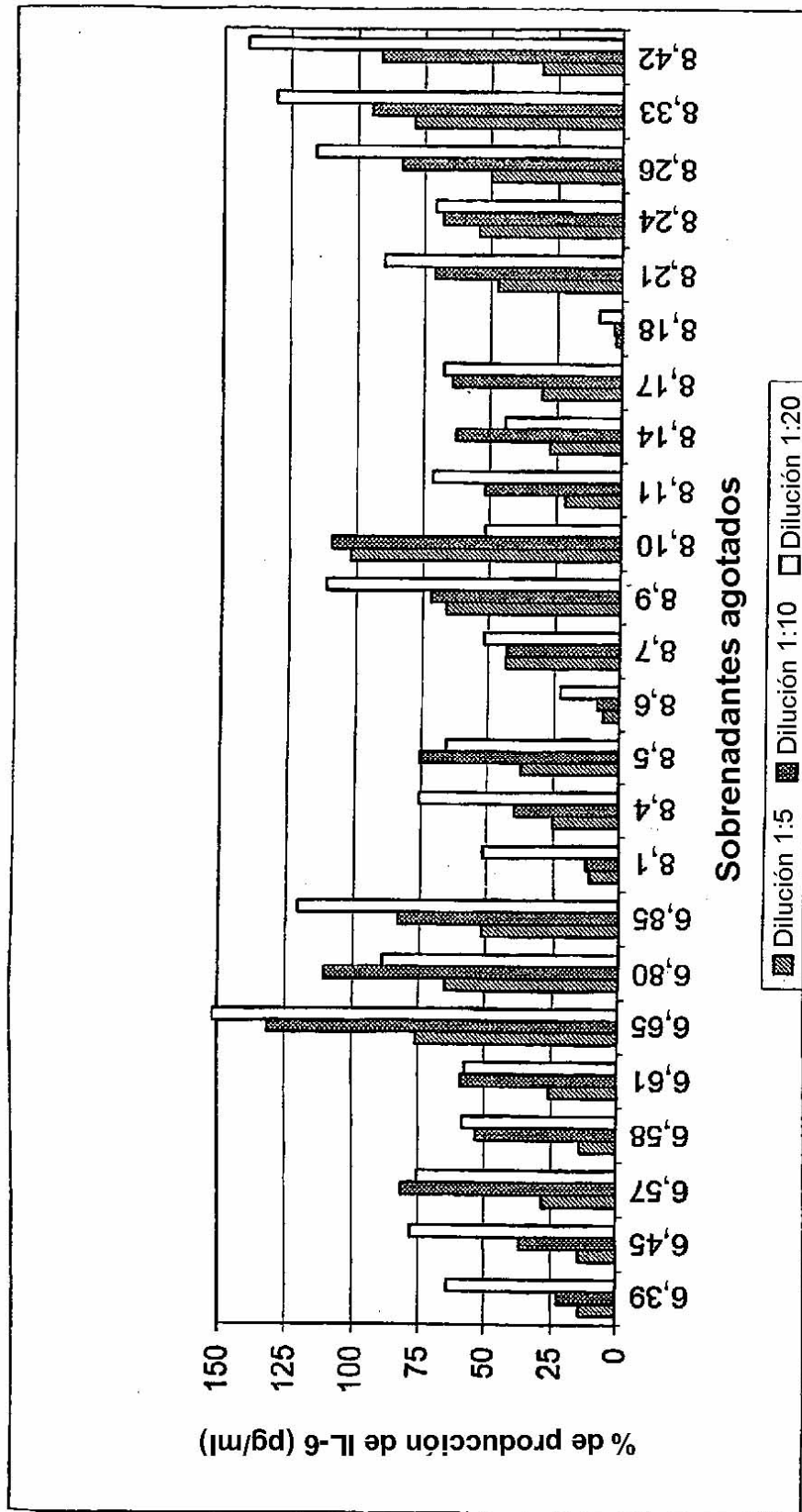


FIG. 1B

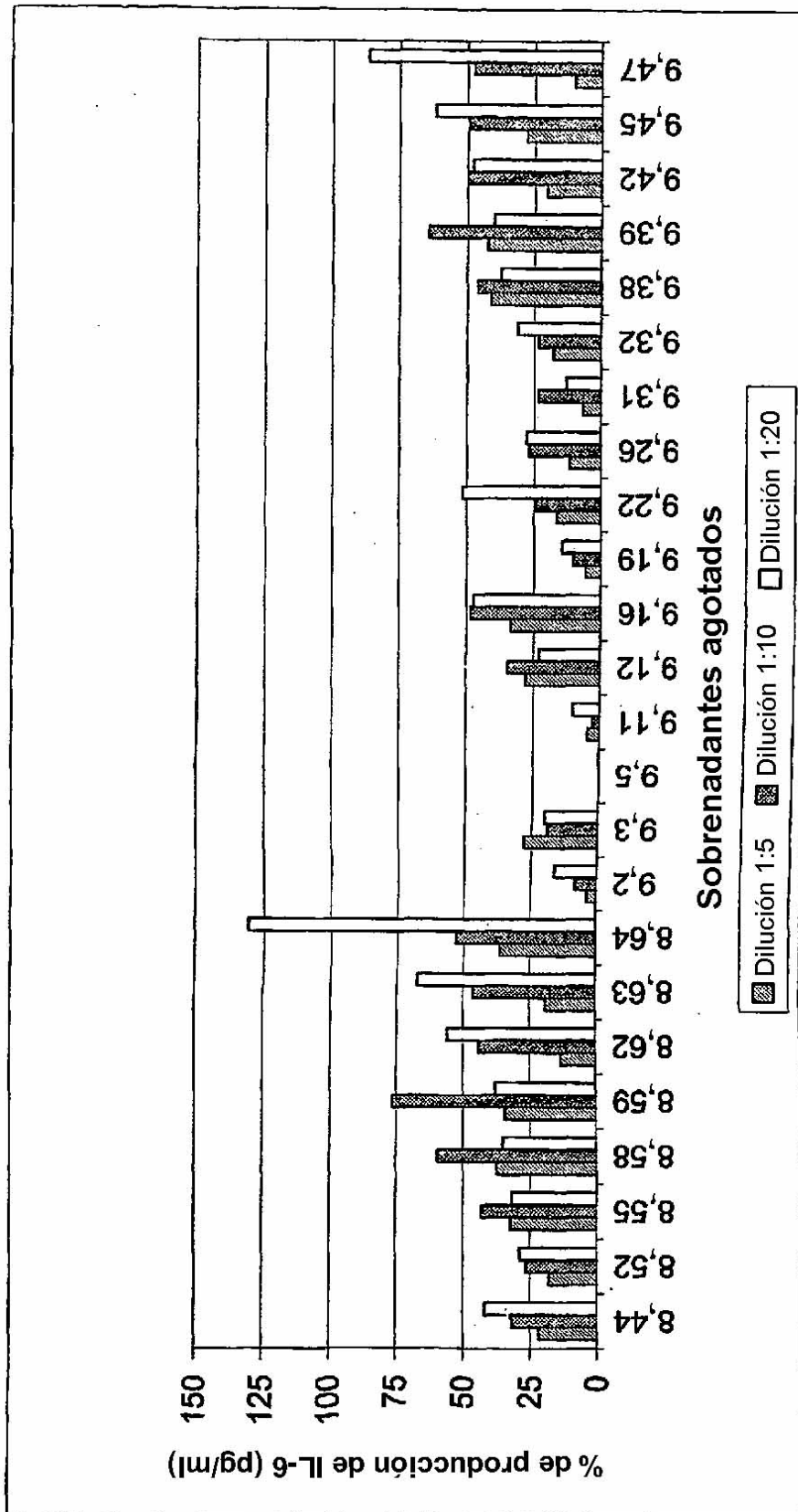


FIG. 1C

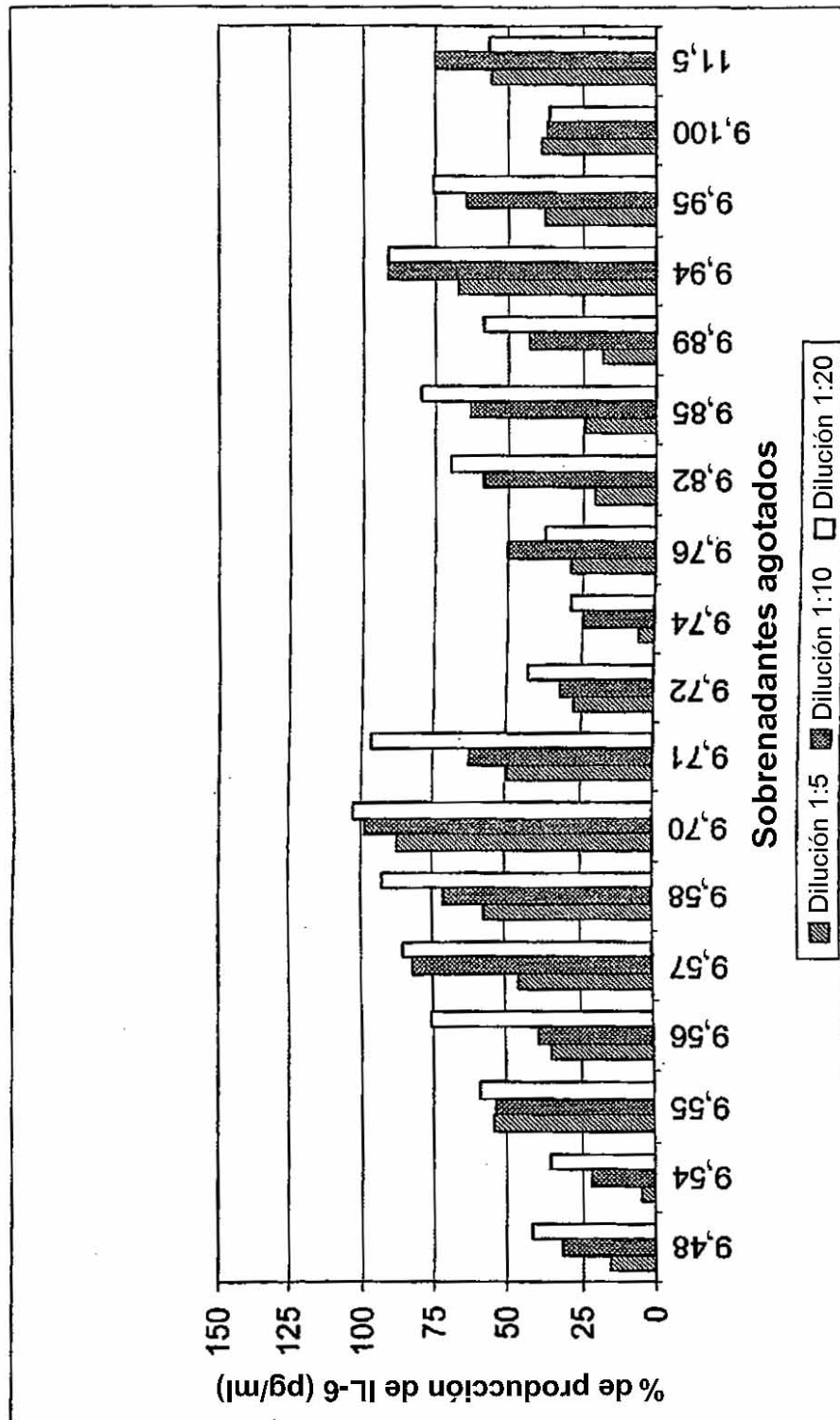


FIG. 1D

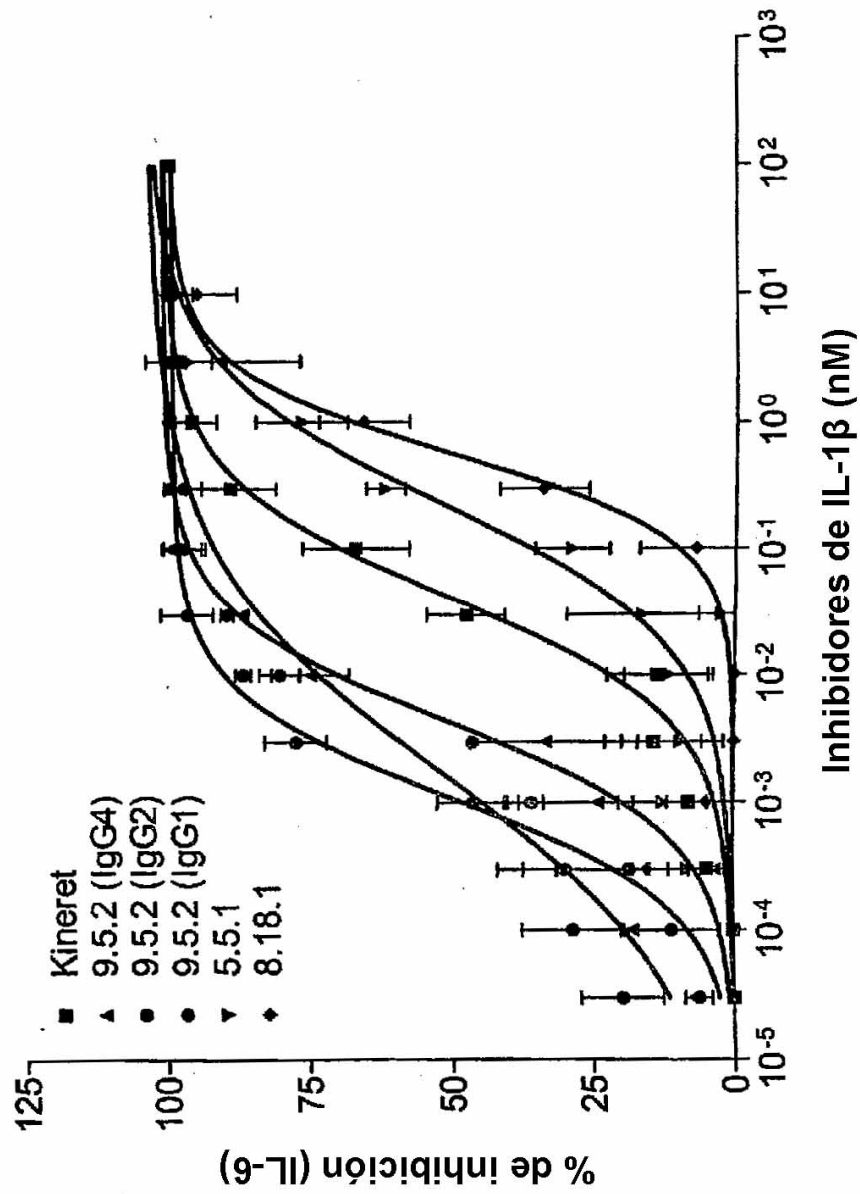


FIG. 2A

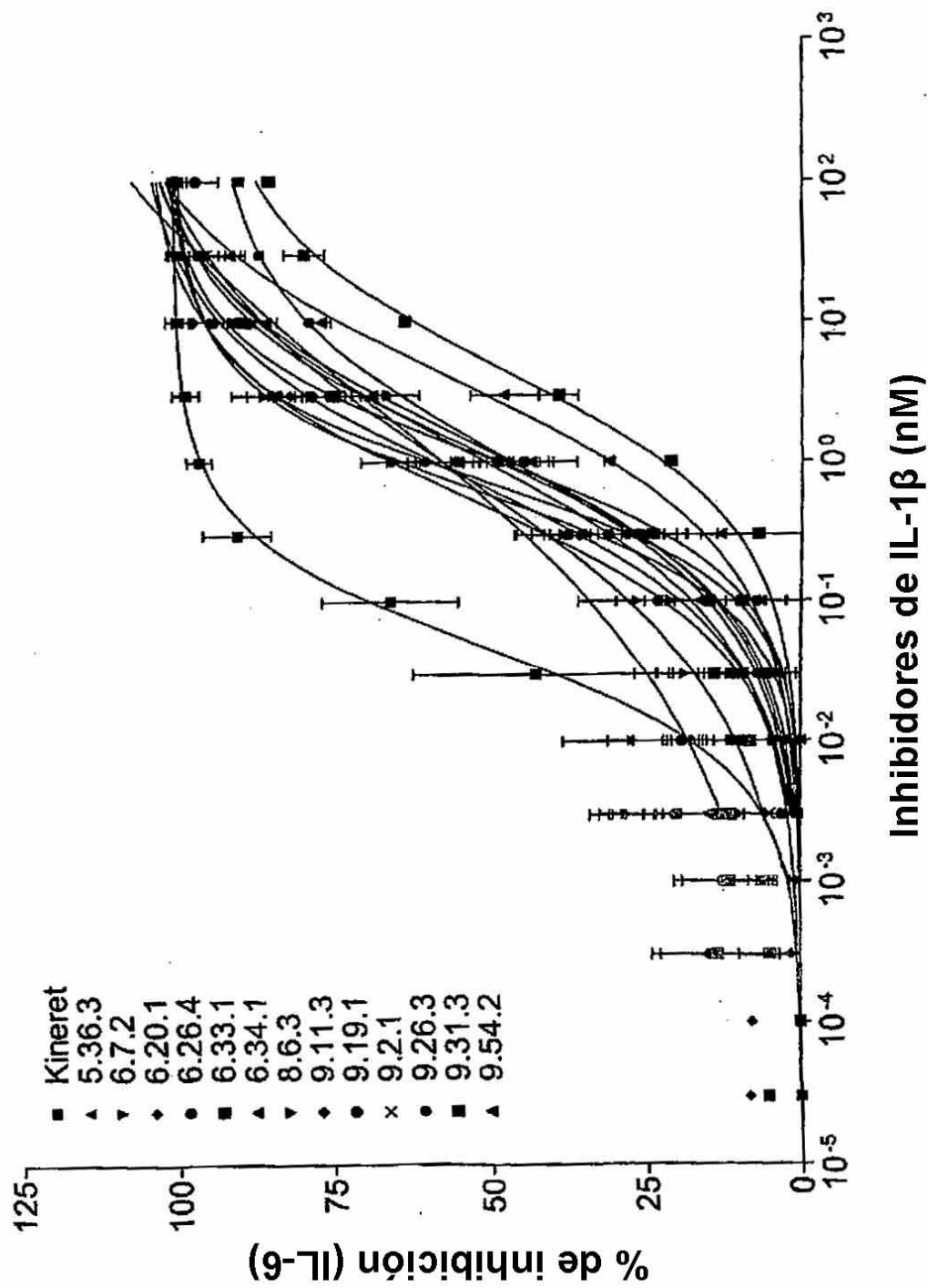


FIG. 2B

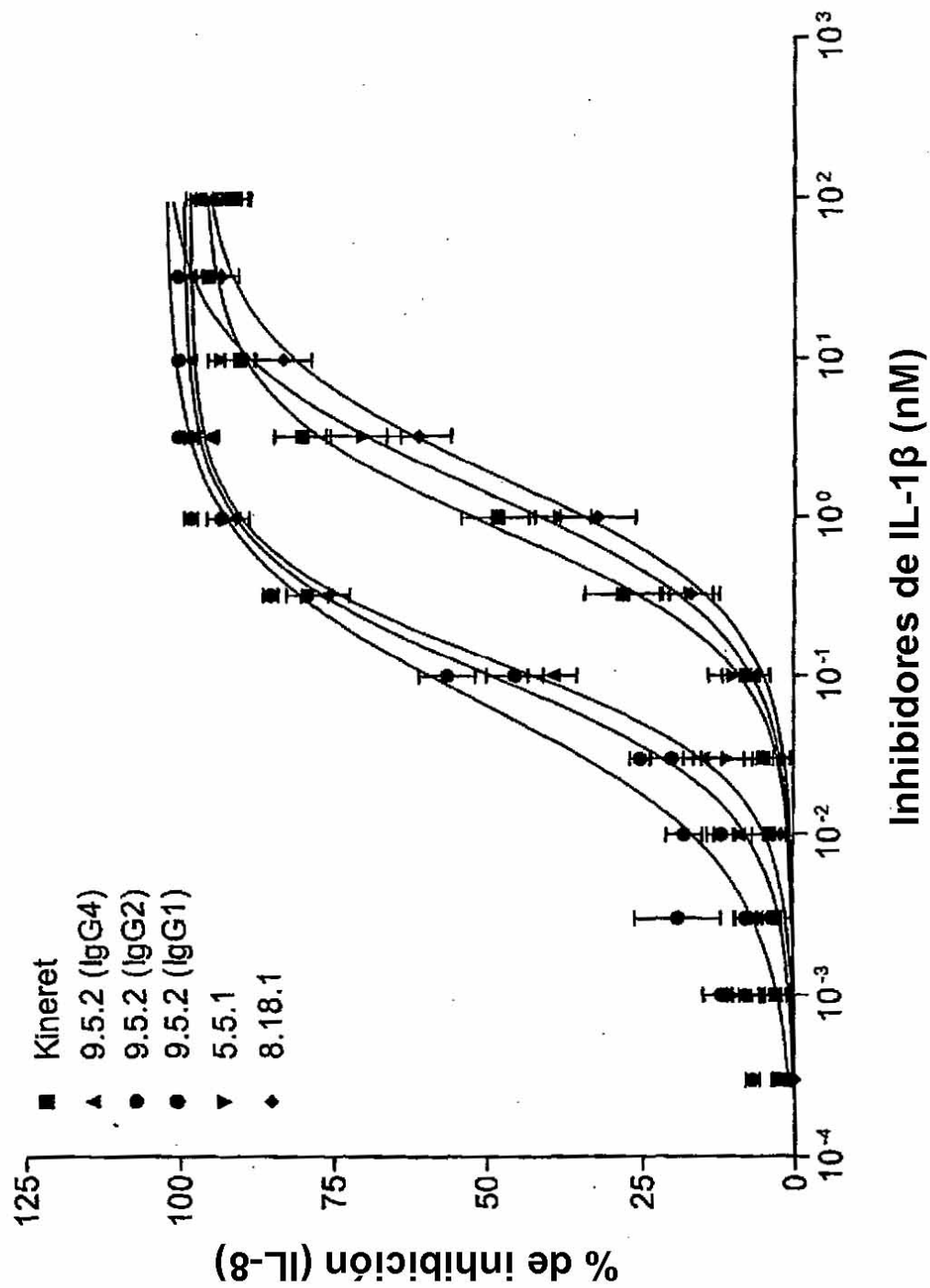


FIG. 3

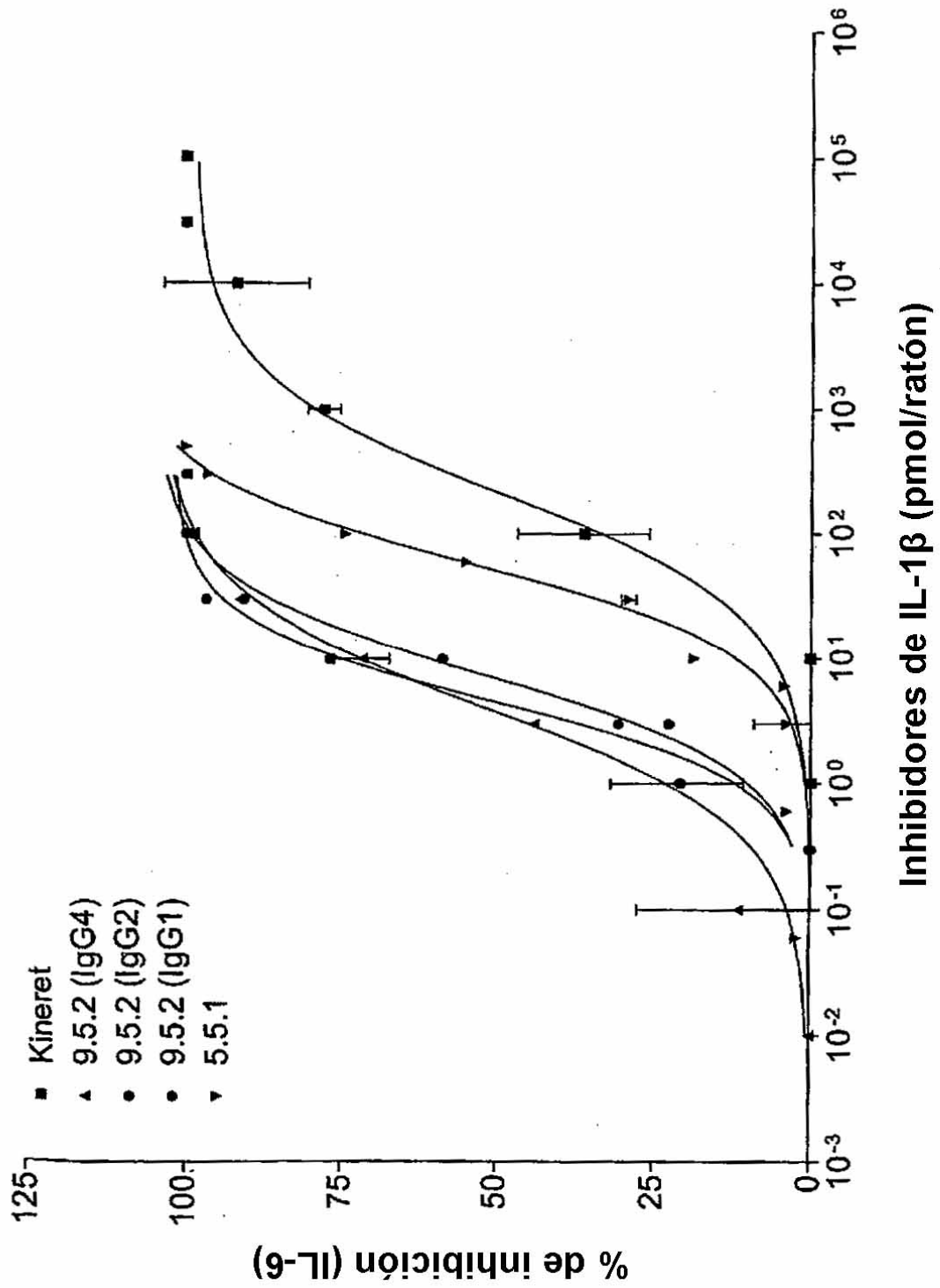


FIG. 4

Modelo de la interacción de IL-1 β con el IL-1R de tipo I

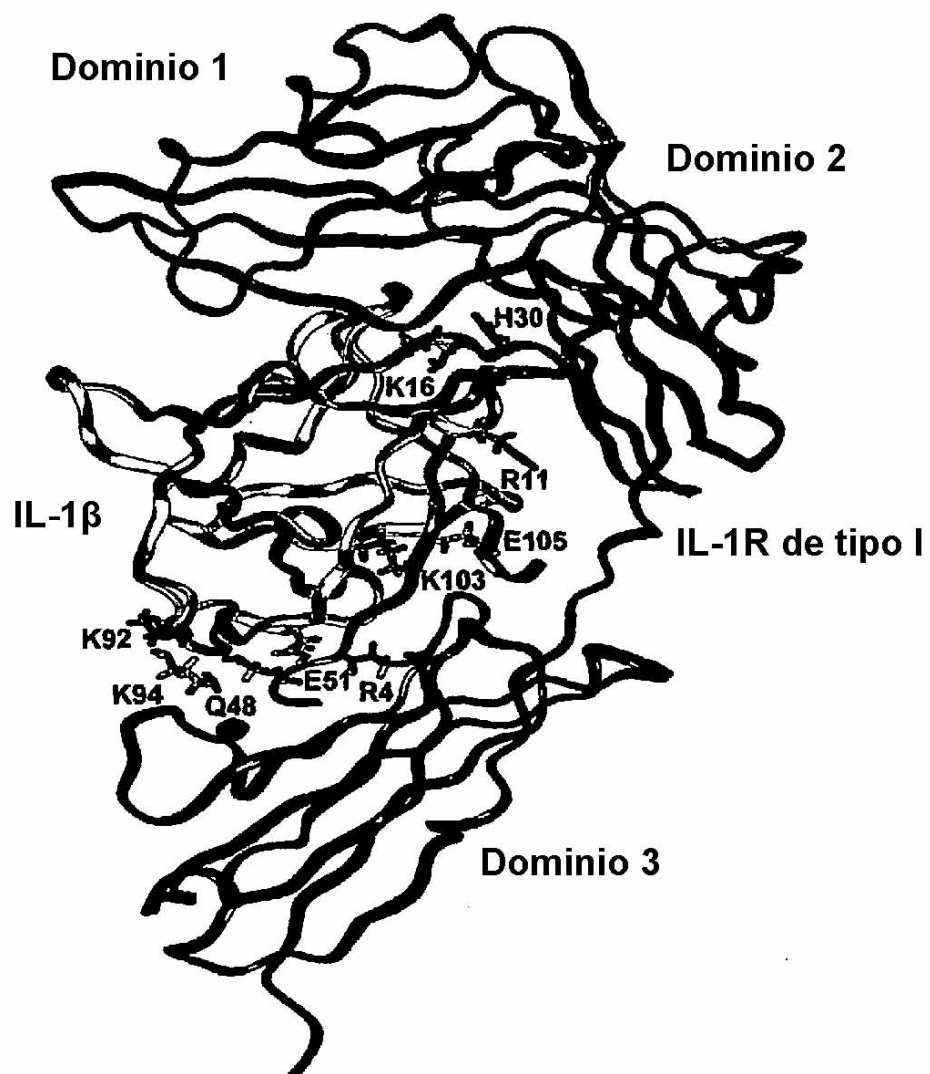


FIG. 5

El bloqueo de R4 de IL-1 β neutraliza la unión del IL-1R de tipo I

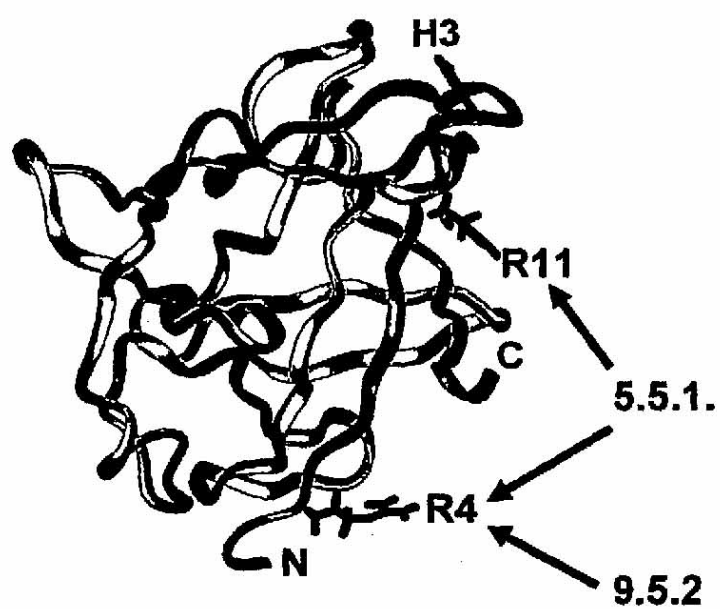


FIG. 6

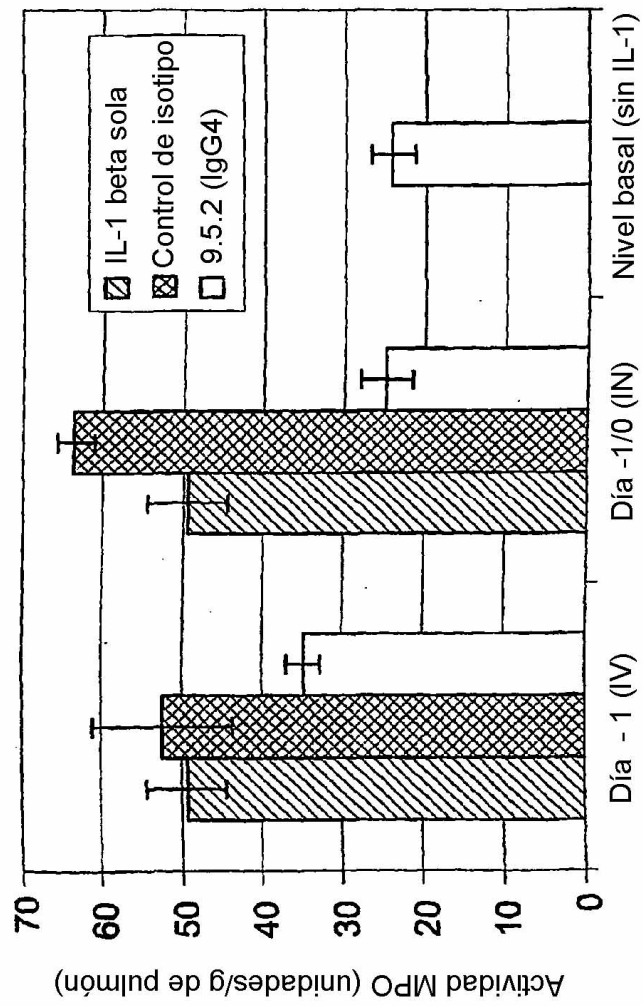


FIG. 7