(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 438 444**

(51) Int. Cl.:
C07K 14/545 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2007** **E 07852398 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013** **EP 2074139**

(54) Título: **Variantes de la familia de IL-1**

(30) Prioridad:

08.09.2006 US 843311 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.01.2014

(73) Titular/es:

AMGEN, INC (100.0%)
Patent Operations, M/S 28-2-C One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US

(72) Inventor/es:

SIMS, JOHN E.;
RENSHAW, BLAIR R.;
GABEL, CHRISTOPHER;
TOWNE, JENNIFER E. y
KETCHEM, RANDAL R.

(74) Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 438 444 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

Variantes de la familia de IL-1

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente estadounidense provisional n.º 60/843.311, presentada el 8 de septiembre de 2006, que se incorpora al presente documento como referencia.

Campo de la invención

Esta solicitud proporciona ácidos nucleicos, polipéptidos, composiciones, ensayos y métodos relacionados con variantes de miembros de la familia de IL-1 que señalizan a través de IL-1Rrp2.

Antecedentes de la invención

La familia de IL-1 incluye varias citocinas cuya función principal es mediar respuestas inmunitarias e inflamatorias. Los primeros miembros descubiertos fueron IL-1 alfa, IL-1 beta, antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra) e IL-18 (conocido previamente como IGIF y a veces como IL-1 gamma). Tras el descubrimiento de proteínas adicionales con homología con estos miembros de la familia de IL-1, se adoptó un sistema de nomenclatura en el que IL-1 alfa se denomina IL-1F1, IL-1 beta como IL-1F2, IL-1ra como IL-1F3 e IL-18 como IL-1F4. Se han clasificado siete citocinas adicionales como miembros de la familia de IL-1 basándose en la similitud de la secuencia de aminoácidos, identidad de la estructura génica y estructura tridimensional predicha o conocida (Sims, J. E. *et al.*, Trends Immunol 22:537, 2001; Dunn, E., *et al.*, Trends Immunol 22:533, 2001; Dunn, E. F., *et al.*, Biochemistry 42:10938, 2003; Schmitz *et al.* Immunity 23:479-490, 2005).

IL-1 alfa, IL-1 beta e IL-1ra (IL-1 F1-3, respectivamente) se unen a receptores que son miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas, el receptor de tipo I de 80 kDa (IL-1RI) y un receptor de tipo II de 68 kDa (IL-1RII), así como un fragmento proteolítico soluble de IL-1RII (sIL-1RII). La unión de IL-1 (alfa o beta) al receptor de IL-1 de tipo I (IL-1R) da como resultado el reclutamiento del homólogo de IL-1R, proteína accesoria de IL-1R (IL-1RAcP o AcP), que no se une directamente a los ligandos pero que se requiere para la transducción de señales (Sims *et al.* Trends Immunol 22;537, 2001); la unión de IL-1ra no. La señalización por IL-18 es muy similar, aunque IL-18 utiliza un complejo receptor diferente (Born, T. L., *et al.*, J Biol Chem 273:29445, 1998). IL-1F5, F6, F8 y F9 hacen uso de la proteína 2 relacionada con IL-1R (IL-1Rrp2), siendo F6, F8 y F9 agonistas de la ruta de este receptor, y siendo IL-1F5 un antagonista de la misma (Debets, R., *et al.*, J Immunol 167:1440, 2001; Towne *et al.* 2004 J Biol Chem 279(14):13677)

Varios miembros de la familia de IL-1 (IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-18, IL-1F7 e IL-33) se sintetizan como moléculas precursoras que se escinden proteolíticamente, por caspasa-1 en el caso de IL-1 beta e IL-18, y por una proteasa o proteasas no identificadas para IL-33, IL-1 alfa e IL-1F7. IL-1ra se activa mediante la escisión de peptidasa señal de un péptido corto desde el extremo N-terminal. Sin embargo, se sabe poco sobre qué procesamiento se produce, si hubiera alguno, con los miembros de la familia restantes.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 proporciona una alineación de las partes N-terminales de IL-1F5, F6, F8 y F9 de tipo natural. Hay una secuencia (Met o Ile)-Xaa-Asp presente en cada una de F5, F6, F8 y F9, marcada mediante el subrayado de los residuos Met/Ile y Asp. Existe un motivo "aminoácido alifático - X - Aspartato u otro aminoácido polar" similar presente en todos los miembros de la familia de IL-1, y esto puede usarse para alinear las secuencias de la familia de IL-1. El motivo consenso se indica mediante @XD en el que @ puede ser un aminoácido alifático tal como Met o Ile y X es un aminoácido cualquiera, D es Asp. En la figura 1, las secuencias se alinean usando el motivo Met/Ile - Xaa - Asp (Met 11 en F5, Ile15 en F6, Ile14 en F8 e Ile27 en F9, respectivamente), de modo que los extremos N-terminales naturales (con metioninas de iniciación) se encuentran a diferentes distancias en el sentido de 5' con respecto al aminoácido alifático, @, del motivo.

La figura 2 son las secuencias de tipo natural de longitud completa de los aminoácidos de IL-1F5, IL-1F6, IL-1F8 e IL-1F9.

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de IL-1F5 aislado que es un antagonista de la activación/transducción de señales a través de IL-1Rrp2, conteniendo el polipéptido de IL-1F5 la secuencia Met-Lys-Asp, que coincide con la secuencia consenso @XD representado en la figura 1, y comprendiendo el polipéptido nueve aminoácidos en el lado N-terminal de la metionina a la que se hizo referencia anteriormente. En una realización, el polipéptido de IL-1F5 es un polipéptido de IL-1F5 humana. En una realización, el polipéptido de IL-1F5 de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una metionina en la posición diez de la secuencia de aminoácidos, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno de la secuencia de aminoácidos. En una realización, el polipéptido de IL-1F5 de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una metionina en la posición diez de la secuencia de aminoácidos, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno de la secuencia de aminoácidos y un aminoácido

seleccionado del grupo que consiste en valina y metionina en el aminoácido N-terminal en la posición uno. En una realización, el polipéptido de IL-1F5 de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una metionina en la posición diez de la secuencia de aminoácidos, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno de la secuencia de aminoácidos y una leucina en la posición dos de su secuencia de aminoácidos. En una realización particular, el polipéptido de IL-1F5 de la invención, comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una metionina en la posición diez de la secuencia de aminoácidos, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno de la secuencia de aminoácidos y un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en valina y metionina en el aminoácido N-terminal en la posición y una leucina en la posición dos.

En realizaciones particulares, el polipéptido de IL-1F5 de la invención comprende una identidad de al menos el 90%, al menos el 95 %, al menos el 98% o al menos el 99% con SEQ ID NO 1 y una metionina en la posición diez de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de IL-1F5 de la invención, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno. En algunas realizaciones, el polipéptido de IL-1F5 aislado de la invención es más antagonista de la activación/transducción de señales a través de IL-1Rrp2 que el polipéptido de IL-1F5 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 1. En algunas realizaciones, el polipéptido de IL-1F5 aislado de la invención es más antagonista de la activación/transducción de señales a través de IL-1Rrp2 en aproximadamente 5 veces, 10 veces, 100 veces, 1.000 veces el nivel de antagonismo de la activación/transducción de señales del polipéptido de IL-1F5 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 1. El nivel de antagonismo de la activación/transducción de señales se mide según el método descrito en el ejemplo 2A.

En una realización particular, el polipéptido de IL-1F5 aislado de la invención tiene una metionina en la posición diez de su secuencia de aminoácidos con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

VLSGALCFRMKDSALKVLILHNNQLLAGGLHAGKVIKGEEISVVPNRWLDASLSPVILGVQGGSQCLSCGVGQEPTLT
LEPVNIMELILGAKESKSFTFYRRDMGLTSSFESAAYPGWFLCTVPEADQPVRLTQLPENGGWNAPITDFYFQQCD
(SEQ ID NO 6),

MLSGALCFRMKDSALKVLILHNNQLLAGGLHAGKVIKGEEISWPNRWLDASLSPVILGVQGGSQCLSCGVGQEPTLTL
EPVNIMELILGAKESKSFTFYRRDMGLTSSFESAAYPGWFLCTVPEADQPVRLTQLPENGGWNAPITDFYFQQCDDY
KDDDDKHHH (SEQ ID NO 7),

MLSGALCFRMKDSALKVLILHNNQLLAGGLHAGKVIKGEEISWPNRWLDASLSPVILGVQGGSQCLSCGVGQEPTLTL
EPVNIMELILGAKESKSFTFYRRDMGLTSSFESAAYPGWFLCTVPEADQPVRLTQLPENGGWNAPITDFYFQQCD
(SEQ ID NO 8) y

MLSGALCFRMKDSALKVLILHNNQLLAGGLHAGKVIKGEEISWPNRWLDASLSPVILGVQGGSQCLSCGVGQEPTLTL
EPVNIMELILGAKESKSFTFYRRDMGLTSSFESAAYPGWFLCTVPEADQPVRLTQLPENGGWNAPITDFYFQQCDDY
KDDDDKHHH (SEQ ID NO 9).

En otra realización, se proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido de IL-1F5 aislado de la invención. En otro aspecto de la invención, se proporciona un vector recombinante que dirige la expresión de un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de IL-1F5 aislado de la invención. En una realización particular, el vector de la invención comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en:

GTCCTGAGTGGGGCGCTGTGCTTCCGAATGAAGGACTCGGCATTGAAGGTGCTTTATCTGCATAATAACCAGCT
TCTAGCTGGAGGGCTGCATGCAGGGAAGGTCATTAAAGGTGAAGAGATCAGCGTGGTCCCCAATCGGTGGCTG
GATGCCAGCCTGTCCCCCGTCATCCTGGGTGTCCAGGGTGGAAGCCAGTGCCTGTCATGTGGGGTGGGGCAG
GAGCCGACTCTAACACTAGAGCCAGTGAACATCATGGAGCTCTATCTTGGTGCCAAGGAATCCAAGAGCTTCAC
CTTCTACCGGCGGGACATGGGGCTCACCTCCAGCTTCGAGTCGGCTGCCTACCCGGGCTGGTTCCTGTGCACG
GTGCCTGAAGCCGATCAGCCTGTCAGACTCACCCAGCTTCCCGAGAATGGTGGCTGGAATGCCCCCATCACAG
ACTTCTACTTCCAGCAGTGTGACTAA (SEQ ID NO 69) y

ATGCTGAGTGGGGCGCTGTGCTTCCGAATGAAGGACTCGGCATTGAAGGTGCTTTATCTGCATAATAACCAGCT
TCTAGCTGGAGGGCTGCATGCAGGGAAGGTCATTAAAGGTGAAGAGATCAGCGTGGTCCCCAATCGGTGGCTG
GATGCCAGCCTGTCCCCCGTCATCCTGGGTGTCCAGGGTGGAAGCCAGTGCCTGTCATGTGGGGTGGGGCAG
GAGCCGACTCTAACACTAGAGCCAGTGAACATCATGGAGCTCTATCTTGGTGCCAAGGAATCCAAGAGCTTCAC
CTTCTACCGGCGGGACATGGGGCTCACCTCCAGCTTCGAGTCGGCTGCCTACCCGGGCTGGTTCCTGTGCACG
GTGCCTGAAGCCGATCAGCCTGTCAGACTCACCCAGCTTCCCGAGAATGGTGGCTGGAATGCCCCCATCACAG
ACTTCTACTTCCAGCAGTGTGACAGATCTGGCAGTTCTGACTACAAGGACGACGACGACAAGGGCAGTTCTCAC
CATCACCATCACCACTAG (SEQ ID NO 70). En otro aspecto, se proporciona una célula huésped transfectada o transducida con un vector recombinante que dirige la expresión de un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de IL-1F5 de la invención. En otro aspecto, se proporciona un método de producción de un polipéptido de IL-1F5 aislado de la invención que comprende cultivar la célula huésped transfectada o transducida con un vector recombinante que dirige la expresión de un polipéptido de IL-1F5 de la invención, en condiciones que promueven la

expresión y aislar el polipéptido de IL-1F5 expresado.

Se proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a un polipéptido de IL-1F5 e impide el antagonismo por IL-1F5 de la transducción de señales a través de IL-1Rrp2. Se proporciona un anticuerpo que se une a un polipéptido de IL-1F5 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8 y SEQ ID NO 9. El anticuerpo contra IL-1F5 es un anticuerpo monoclonal, particularmente un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo totalmente humano. La invención proporciona una composición, particularmente una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo contra IL-1F5 de la invención y un diluyente, excipiente o portador fisiológicamente aceptable. Se proporciona un método de estimulación del sistema inmunitario de un sujeto inmunosuprimido, que comprende administrar el anticuerpo anti-IL-1F5 de la invención a un sujeto inmunosuprimido en una cantidad suficiente para estimular el sistema inmunitario del paciente.

En otro aspecto, se proporciona una composición, particularmente una composición farmacéutica, que comprende un polipéptido de IL-1F5 de la invención y un diluyente, excipiente o portador fisiológicamente aceptable. En otra realización, la invención proporciona un método de tratamiento de un estado inflamatorio o autoinmunitario en un sujeto en el que el estado inflamatorio o autoinmunitario está mediado por IL-1Rrp2, que comprende administrar al sujeto una cantidad del polipéptido de IL-1F5 de la invención suficiente para reducir al menos un síntoma del estado inflamatorio o autoinmunitario en el sujeto. En una realización, el estado que va a tratarse es un estado inflamatorio de la piel, los pulmones o las vías respiratorias mediado por IL-1Rrp2. En una realización particular, el estado que va a tratarse se selecciona del grupo que consiste en psoriasis, dermatitis seborreica, dermatitis atópica, incluyendo dermatitis atópica crónica, dermatitis de contacto alérgica, liquen simple crónico, pitiriasis rubra pilaris, dermatitis numular, asma, rinitis alérgica, enfermedad por reflujo gastroesofágico, estados artríticos incluyendo, artritis reumatoide, artritis psoriásica y osteoartritis. En realizaciones particulares de los métodos anteriores, el sujeto es humano.

En un aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de IL-1F6 aislado que es un agonista de la activación/transducción de señales a través de IL-1Rrp2, conteniendo el polipéptido de IL-1F6 la secuencia Ile-Gln-Asp, que coincide con la secuencia consenso @XD descrita en la figura 1, y comprendiendo el polipéptido nueve aminoácidos en el lado N-terminal de la isoleucina a la que se hizo referencia anteriormente. En una realización, el polipéptido de IL-1F6 es un polipéptido de IL-1F6 humana. En una realización, el polipéptido de IL-1F6 de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una isoleucina en la posición diez de su secuencia de aminoácidos, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno. En una realización, el polipéptido de IL-1F6 de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una isoleucina en la posición diez de su secuencia de aminoácidos, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno y un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina y metionina en el aminoácido N-terminal en la posición uno. En una realización, el polipéptido de IL-1F6 de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una isoleucina en la posición diez de su secuencia de aminoácidos, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno, y una isoleucina en la posición dos de su secuencia de aminoácidos. En una realización particular, el polipéptido de IL-1F6 de la invención, comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una isoleucina en la posición diez de la secuencia de aminoácidos, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno, y un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina y metionina en el aminoácido N-terminal en la posición y una isoleucina en la posición dos.

En realizaciones particulares, el polipéptido de IL-1F6 comprende una identidad de al menos 90%, al menos el 95%, al menos el 97% o al menos el 98% con SEQ ID NO 2 o con SEQ ID NO 2 excepto porque hay una arginina en la posición de aminoácido 12 en vez de una glutamina y una isoleucina en la posición diez, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno de la secuencia de aminoácidos de IL-1F6 de la invención. En algunas realizaciones, el polipéptido de IL-1F6 aislado de la invención es más agonista de la activación/transducción de señales a través de IL-1Rrp2 que el polipéptido de IL-1F6 que tiene la secuencia de aminoácidos N-terminal de SEQ ID NO 2. En algunas realizaciones, el polipéptido de IL-1F6 aislado de la invención es más agonista de la activación/transducción de señales a través de IL-1Rrp2 en aproximadamente 5 veces, 10 veces, 100 veces, 200 veces, 1.000 veces, 2.000 veces, 10.000 veces, 50.000 veces el nivel de agonismo de la activación/transducción de señales del polipéptido de IL-1F6 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 2. El nivel de agonismo de la activación/transducción de señales se mide según el método descrito en el ejemplo 2B.

En otro aspecto, la invención proporciona un polipéptido de IL-1F6 aislado que es un agonista de la activación/transducción de señales a través de IL-1Rrp2, en el que el polipéptido de IL-1F6 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una isoleucina en la posición diez de su secuencia de aminoácidos, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno y una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

KIDTPQQGSIQDINHRVWVLQDQTLIAVPRKDRMSPVTIALISCRHVETLEKDRGNPIILGLNGLNLCLMCAKVGDQPTL QLKEKDIMDLYNQPEPVKSFLFYHSQSGRNSTFESVAFPGWFIAVSSEGGCPLILTQELGKANTTDFGLTMLF (SEQ ID NO 10),

KIDTPQQGSIQDINHRVWVLQDQTLIAVPRKDRMSPVTIALISCRHVETLEKDRGNPIILGLNGLNLCLMCAKVGDQPTL

QLKEKDIMDLYNQPEPVKSFLFYHSQSGRNSTFESVAFPGWFIAVSSEGGCPLILTQELGKANTTDFGLTMLFDYKDD DDKHHH (SEQ ID NO 11),

MIDTPQQGSIQDINHRVWVLQDQTLIAVPRKDRMSPVTIALISCRHVETLEKDRGNPIYLGLNGLNLCLMCAKVGDQPT LQLKEKDIMDLYNQPEPVKSFLFYHSQSGRNSTFESVAFPGWFIAVSSEGGCPLILTQELGKANTTDFGLTMLF (SEQ ID NO 12),

MIDTPQQGSIQDINHRVWVLQDQTLIAVPRKDRMSPVTIALISCRHVETLEKDRGNPIYLGLNGLNLCLMCAKVGDQPT LQLKEKDIMDLYNQPEPVKSFLFYHSQSGRNSTFESVAFPGWFIAVSSEGGCPLILTQELGKANTTDFGLTMLFDYKD DDDKHHH (SEQ ID NO 13),

KIDTPQRGSIQDINHRVWVLQDQTLIAVPRKDRMSPVTIALISCRHVETLEKDRGNPIILGLNGLNLCLMCAKVGDQPTL QLKEKDIMDLYNQPEPVKSFLFYHSQSGRNSTFESVAFPGWFIAVSSEGGCPLILTQELGKANTTDFGLTMLF (SEQ ID NO 65),

KIDTPQRGSIQDINHRVWVLQDQTLIAVPRKDRMSPVTIALISCRHVETLEKDRGNPIILGLNGLNLCLMCAKVGDQPTL QLKEKDIMDLYNQPEPVKSFLFYHSQSGRNSTFESVAFPGWFIAVSSEGGCPLILTQELGKANTTDFGLTMLFDYKDD DDKHHH (SEQ ID NO 66),

MIDTPQRGSIQDINHRVWVLQDQTLIAVPRKDRMSPVTIALISCRHVETLEKDRGNPIILGLNGLNLCLMCAKVGDQPTL QLKEKDIMDLYNQPEPVKSFLFYHSQSGRNSTFESVAFPGWFIAVSSEGGCPLILTQELGKANTTDFGLTMLF (SEQ ID NO 67) y

MIDTPQRGSIQDINHRVWVLQDQTLIAVPRKDRMSPVTIALISCRHVETLEKDRGNPIILGLNGLNLCLMCAKVGDQPTL QLKEKDIMDLYNQPEPVKSFLFYHSQSGRNSTFESVAFPGWFIAVSSEGGCPLILTQELGKANTTDFGLTMLFDYKDD DDKHHH (SEQ ID NO 68).

En otra realización, se proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido de IL-1F6 aislado de la invención. En otro aspecto de la invención, se proporciona un vector recombinante que dirige la expresión de un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de IL-1F6 aislado de la invención. En una realización particular, el vector de la invención comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en:

AAAATTGACACACCTCAGCGGGGGAGCATTCAGGATATCAATCATCGGGTGTGGGTTCTTCAGGACCAGACGCT CATAGCAGTCCCGAGGAAGGACCGTATGTCTCCAGTCACTATTGCCTTAATCTCATGCCGACATGTGGAGACCC TTGAGAAAGACAGAGGGAACCCCATCTACCTGGGCCTGAATGGACTCAATCTCTGCCTGATGTGTGCTAAAGTC GGGGACCAGCCCACACTGCAGCTGAAGGAAAAGGATATAATGGATTTGTACAACCAACCCGAGCCTGTGAAGTC CTTTCTCTTCTACCACAGCCAGAGTGGCAGGAACTCCACCTTCGAGTCTGTGGCTTTCCCTGGCTGGTTCATCG CTGTCAGCTCTGAAGGAGGCTGTCCTCTCATCCTTACCCAAGAACTGGGGAAAGCCAACACTACTGACTTTGGG TTAACTATGCTGTTTTAA (SEQ ID NO 71) y

ATGATTGACACACCTCAGCGGGGGAGCATTCAGGATATCAATCATCGGGTGTGGGTTCTTCAGGACCAGACGCT CATAGCAGTCCCGAGGAAGGACCGTATGTCTCCAGTCACTATTGCCTTAATCTCATGCCGACATGTGGAGACCC TTGAGAAAGACAGAGGGAACCCCATCTACCTGGGCCTGAATGGACTCAATCTCTGCCTGATGTGTGCTAAAGTC GGGGACCAGCCCACACTGCAGCTGAAGGAAAAGGATATAATGGATTTGTACAACCAACCCGAGCCTGTGAAGTC CTTTCTCTTCTACCACAGCCAGAGTGGCAGGAACTCCACCTTCGAGTCTGTGGCTTTCCCTGGCTGGTTCATCG CTGTCAGCTCTGAAGGAGGCTGTCCTCTCATCCTTACCCAAGAACTGGGGAAAGCCAACACTACTGACTTTGGG TTAACTATGCTGTTTAGATCTGGCAGTTCTGACTACAAGGACGACGACGACAAGGGCAGTTCTCACCATCACCAT CACCACTAG (SEQ ID NO 72). En otro aspecto, se proporciona una célula huésped transfectada o transducida con un vector recombinante que dirige la expresión de un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de IL-1F6 de la invención. En otro aspecto, se proporciona un método de producción de un polipéptido de IL-1F6 aislado de la invención que comprende cultivar la célula huésped transfectada o transducida con un vector recombinante que dirige la expresión de un polipéptido de IL-1F6 de la invención, en condiciones que promueven la expresión y aislar el polipéptido de IL-1F6 expresado.

En otro aspecto, se proporciona una composición, particularmente una composición farmacéutica, que comprende un polipéptido de IL-1F6 de la invención y un diluyente, excipiente o portador fisiológicamente aceptable. Se proporciona un método de estimulación del sistema inmunitario de un sujeto inmunosuprimido, que comprende administrar el polipéptido de IL-1F6 según la invención a un sujeto inmunosuprimido en una cantidad suficiente para estimular el sistema inmunitario del sujeto.

Se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a IL-1F6, en el que IL-1F6 puede ser una IL-1F6 de longitud completa o una versión de truncamiento de IL-1F6 de longitud completa, e impide la escisión proteolítica de la misma, particularmente la escisión proteolítica para dar una forma más activa en la que la actividad está en relación a la de la IL-1F6 de longitud completa. También se proporciona un anticuerpo que se une a un polipéptido de IL-1F6 de la invención, e impide la activación/transducción de señales a través de IL-1FRrp2. En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une a un polipéptido de IL-1F6 seleccionado del grupo que consiste en: SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 65, SEQ ID NO 66, SEQ ID

NO 67 y SEQ ID NO 68. En algunas realizaciones, el anticuerpo contra IL-1F6 de la invención, es un anticuerpo monoclonal, particularmente un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo totalmente humano. La invención proporciona una composición, particularmente una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo contra IL-1F6 de la invención y un diluyente, excipiente o portador fisiológicamente aceptable.

La descripción también proporciona, un método de tratamiento de un estado inflamatorio o autoinmunitario mediado por IL-1Rrp2, que comprende administrar el anticuerpo contra IL-1F6 de la invención a un sujeto en una cantidad suficiente para mejorar al menos un síntoma mediado por IL-1Rrp2 del estado. En una realización, el estado que va a tratarse es un estado inflamatorio de la piel, los pulmones o las vías respiratorias mediado por IL-1Rrp2. En una realización particular, el estado que va a tratarse se selecciona del grupo que consiste en psoriasis, dermatitis seborreica, dermatitis atópica, incluyendo dermatitis atópica crónica, dermatitis de contacto alérgica, liquen simple crónico, pitiriasis rubra pilaris, dermatitis numular, asma, rinitis alérgica, enfermedad por reflujo gastroesofágico, estados artríticos incluyendo, artritis reumatoide, artritis psoriásica, y osteoartritis. En realizaciones particulares, el sujeto que va a tratarse en los métodos anteriores es un ser humano.

En un aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de IL-1F8 aislado que es un agonista de la activación/transducción de señales a través de IL-1Rrp2, conteniendo el polipéptido de IL-1F8 la secuencia Ile-Arg-Asp, que coincide con la secuencia consenso @XD descrita en la figura 1, y comprendiendo el polipéptido nueve aminoácidos en el lado N-terminal de la isoleucina a la que se hizo referencia anteriormente. En una realización, el polipéptido de IL-1F8 es un polipéptido de IL-1F8 humana. En una realización, el polipéptido de IL-1F8 de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una isoleucina en la posición diez de su secuencia de aminoácidos, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno. En una realización, el polipéptido de IL-1F8 de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una isoleucina en la posición diez de su secuencia de aminoácidos, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno y un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en arginina y metionina en el aminoácido N-terminal en la posición uno. En una realización, el polipéptido de IL-1F8 de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una isoleucina en la posición diez de su secuencia de aminoácidos, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno, y un ácido glutámico en la posición dos de su secuencia de aminoácidos. En una realización particular, el polipéptido de IL-1F8 de la invención, comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una isoleucina en la posición diez de la secuencia de aminoácidos, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno, y un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en arginina y metionina en el aminoácido N-terminal en la posición y un ácido glutámico en la posición dos.

En realizaciones particulares, el polipéptido de IL-1F8 aislado comprende una identidad de al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 98% con SEQ ID NO 3 y una isoleucina en la posición diez, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno de la secuencia de aminoácidos de IL-1F8 de la invención. En algunas realizaciones, el polipéptido de IL-1F8 aislado de la invención es más agonista de la activación/transducción de señales a través de IL-1Rrp2 que el polipéptido de IL-1F8 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 3. En algunas realizaciones, el polipéptido de IL-1F8 aislado de la invención es más agonista de la activación/transducción de señales a través de IL-1Rrp2 en aproximadamente 5 veces, 10 veces, 100 veces, 200 veces, 1.000 veces, 3.000 veces, 5.000 veces, 10.000 veces, 50.000 veces el nivel de agonismo de la activación/transducción de señales del polipéptido de IL-1F8 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 3. El nivel de agonismo de la activación/transducción de señales se mide según el método descrito en el ejemplo 2B.

En otro aspecto, la invención proporciona un polipéptido de IL-1F8 aislado que es un agonista de la activación/transducción de señales a través de IL-1Rrp2, comprendiendo el polipéptido de IL-1F8 una secuencia de aminoácidos que tiene una isoleucina en la posición diez de su secuencia de aminoácidos, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno y una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

REAAPKSYAIRDSRQMVWVLSGNSLIAAPLSRSIKPVTLHLIACRDTEFSDKEKGNMVYLGIKGKDLCLFCAEIQGKPTL QLKEKNIMDLYVEKKAQKPFLFFHNKEGSTSVFQSVSYPGWFIATSTTSGQPIFLTKERGITNNTNFILDSVE (SEQ ID NO 14),

REAAPKSYAIRDSRQMVWVLSGNSLIAAPLSRSIKPVTLHLIACRDTEFSDKEKGNMVYLGIKGKDLCLFCAEIQGKPTL QLKEKNIMDLYVEKKAQKPFLFFHNKEGSTSVFQSVSYPGWFIATSTTSGQPIFLTKERGITNNTNFILDSVEDYKDDD DKHHH (SEQ ID NO 15);

MEAAPKSYAIRDSRQMVWVLSGNSLIAAPLSRSIKPVTLHLIACRDTEFSDKEKGNMVYLGIKGKDLCLFCAEIQGKPT LQLKEKNIMDLYVEKKAQKPFLFFHNKEGSTSVFQSVSYPGWFIATSTTSGQPIFLTKERGITNNTNFILDSVE (SEQ ID NO 16) y

MEAAPKSYAIRDSRQMVWVLSGNSLIAAPLSRSIKPVTLHLIACRDTEFSDKEKGNMVYLGIKGKDLCLFCAEIQGKPT LQLKEKNIMDLYVEKKAQKPFLFFHNKEGSTSVFQSVSYPGWFIATSTTSGQPIFLTKERGITNNTNFILDSVEDYKDD DDKHHH (SEQ ID NO 17).

En otra realización, se proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido de IL-1F8

aislado de la invención. En otro aspecto de la invención, se proporciona un vector recombinante que dirige la expresión de un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de IL-1F8 aislado de la invención. En una realización particular, el vector de la invención comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en:

CGCGAGGCAGCACCCAAATCCTATGCTATTCGTGATTCTCGACAGATGGTGTGGGTCCTGAGTGGAAATTCTTT
AATAGCAGCTCCTCTTAGCCGCAGCATTAAGCCTGTCACTCTTCATTTAATAGCCTGTAGAGACACAGAATTCAG
TGACAAGGAAAAGGGTAATATGGTTTACCTGGGAATCAAGGGAAAAGATCTCTGTCTCTTCTGTGCAGAAATTCA
GGGCAAGCCTACTTTGCAGCTTAAGGAAAAAAATATCATGGACCTGTATGTGGAGAAGAAAGCACAGAAGCCCT
TTCTCTTTTTCCACAATAAAGAAGGCTCCACTTCTGTCTTTCAGTCAGTCTCTTACCCTGGCTGGTTCATAGCCAC
CTCCACCACATCAGGACAGCCCATCTTTCTCACCAAGGAGAGAGGCATAACTAATAACACTAACTTCTACTTAGA
TTCTGTGGAATAA (SEQ ID NO 73) y

ATGGAGGCAGCACCCAAATCCTATGCTATTCGTGATTCTCGACAGATGGTGTGGGTCCTGAGTGGAAATTCTTTA
ATAGCAGCTCCTCTTAGCCGCAGCATTAAGCCTGTCACTCTTCATTTAATAGCCTGTAGAGACACAGAATTCAGT
GACAAGGAAAAGGGTAATATGGTTTACCTGGGAATCAAGGGAAAAGATCTCTGTCTCTTCTGTGCAGAAATTCAG
GGCAAGCCTACTTTGCAGCTTAAGGAAAAAAATATCATGGACCTGTATGTGGAGAAGAAAGCACAGAAGCCCTTT
CTCTTTTTCCACAATAAAGAAGGCTCCACTTCTGTCTTTCAGTCAGTCTCTTACCCTGGCTGGTTCATAGCCACCT
CCACCACATCAGGACAGCCCATCTTTCTCACCAAGGAGAGAGGCATAACTAATAACACTAACTTCTACTTAGATT
CTGTGGAAGGATCTGGCAGTTCTGACTACAAGGACGACGACGACAAGGGCAGTTCTCACCATCACCATCACCAC
TAG (SEQ ID NO 74). En otro aspecto, se proporciona una célula huésped transfectada o transducida con un vector recombinante que dirige la expresión de un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de IL-1F8 de la invención. En otro aspecto, se proporciona un método de producción de un polipéptido de IL-1F8 aislado de la invención que comprende cultivar la célula huésped transfectada o transducida con un vector recombinante que dirige la expresión de un polipéptido de IL-1F8 de la invención, en condiciones que promueven la expresión y aislar el polipéptido de IL-1F8 expresado.

En otro aspecto, se proporciona una composición, particularmente una composición farmacéutica, que comprende un polipéptido de IL-1F8 de la invención y un diluyente, excipiente o portador fisiológicamente aceptable. Se proporciona un método de estimulación del sistema inmunitario de un sujeto inmunosuprimido, que comprende administrar el polipéptido de IL-1F8 según la invención a un sujeto inmunosuprimido en una cantidad suficiente para estimular el sistema inmunitario del sujeto. En realizaciones particulares de los métodos anteriores, el sujeto es un ser humano.

Se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a IL-1F8, en el que IL-1F8 puede ser una IL-1F8 de longitud completa o una versión de truncamiento de IL-1F8 de longitud completa, e impide la escisión proteolítica de la misma, particularmente la escisión proteolítica para dar una forma más activa en la que la actividad está con relación a la de la IL-1F8 de longitud completa. También se proporciona un anticuerpo que se une a un polipéptido de IL-1F8 de la invención, e impide la activación/transducción de señales a través de IL-1FRrp2. En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une a un polipéptido de IL-1F8 seleccionado del grupo que consiste en: SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 16 y SEQ ID NO 17. En algunas realizaciones, el anticuerpo contra IL-1F8 de la invención, es un anticuerpo monoclonal, particularmente un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo totalmente humano. La descripción proporciona una composición, particularmente una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo contra IL-1F8 de la invención y un diluyente, excipiente o portador fisiológicamente aceptable.

La invención también proporciona, un método de tratamiento de un estado inflamatorio o autoinmunitario mediado por IL-1Rrp2, que comprende administrar el anticuerpo contra IL-1F8 de la invención a un sujeto en una cantidad suficiente para mejorar al menos un síntoma mediado por IL-1Rrp2 del estado. En una realización, el estado que va a tratarse es un estado inflamatorio de la piel, los pulmones o las vías respiratorias mediado por IL-1Rrp2. En una realización particular, el estado que va a tratarse se selecciona del grupo que consiste en psoriasis, dermatitis seborreica, dermatitis atópica, incluyendo dermatitis atópica crónica, dermatitis de contacto alérgica, liquen simple crónico, pitiriasis rubra pilaris, dermatitis numular, asma, rinitis alérgica, enfermedad por reflujo gastroesofágico, estados artríticos incluyendo, artritis reumatoide, artritis psoriásica y osteoartritis.

En un aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de IL-1F9 aislado que es un agonista de la activación/transducción de señales a través de IL-1Rrp2, comprendiendo el polipéptido de IL-1F9 la secuencia consenso @XD descrita en la figura 1, conteniendo el polipéptido de IL-1F9 la secuencia Ile-Asn-Asp, que coincide con la secuencia consenso @XD, y comprendiendo el polipéptido nueve aminoácidos en el lado N-terminal de la isoleucina a la que se hizo referencia anteriormente. En una realización, el polipéptido de IL-1F9 es un polipéptido de IL-1F9 humana. En una realización, el polipéptido de IL-1F9 de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una isoleucina en la posición diez de su secuencia de aminoácidos, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno. En una realización, el polipéptido de IL-1F9 de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una isoleucina en la posición diez de su secuencia de aminoácidos, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno y un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en serina y metionina en el aminoácido N-terminal en la posición uno. En una realización, el polipéptido de IL-1F9 de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una

isoleucina en la posición diez de su secuencia de aminoácidos, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno, y una metionina en la posición dos de su secuencia de aminoácidos. En una realización particular, el polipéptido de IL-1F9 de la invención, comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una isoleucina en la posición diez de la secuencia de aminoácidos, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno, y un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en serina y metionina en el aminoácido N-terminal en la posición y un ácido glutámico en la posición dos.

En realizaciones particulares, el polipéptido de IL-1F9 aislado comprende una identidad de al menos el 85% o al menos el 89% con SEQ ID NO 4 y una isoleucina en la posición diez, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno de la secuencia de aminoácidos de IL-1F9 de la invención. En algunas realizaciones, el polipéptido de IL-1F9 aislado de la invención es más agonista de la activación/transducción de señales a través de IL-1Rrp2 que el polipéptido de IL-1F9 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 4. En algunas realizaciones, el polipéptido de IL-1F9 aislado de la invención es más agonista de la activación/transducción de señales a través de IL-1Rrp2 en aproximadamente 5 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces, 600 veces, 1.000 veces, 3.000 veces, 5.000 veces, 10.000 veces o 50.000 veces el nivel de agonismo de la activación/transducción de señales del polipéptido de IL-1F9 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 4. El nivel de agonismo de la activación/transducción de señales se mide según el método descrito en el ejemplo 2B.

En otro aspecto, la invención proporciona un polipéptido de IL-1F9 aislado que es un agonista de la activación/transducción de señales a través de IL-1Rrp2, comprendiendo el polipéptido de IL-1F9 una secuencia de aminoácidos que tiene una isoleucina en la posición diez de su secuencia de aminoácidos, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno y una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

SMCKPITGTINDLNQQVWTLQGQNLVAVPRSDSVTPVTVAVITCKYPEALEQGRGDPIYLGIQNPEMCLYCEKVGEQP TLQLKEQKIMDLYGQPEPVKPFLFYRAKTGRTSTLESVAFPDWFIASSKRDQPIILTSELGKSYNTAFELNIND (SEQ ID NO 18),

SMCKPITGTINDLNQQVWTLQGQNLVAVPRSDSVTPVTVAVITCKYPEALEQGRGDPIYLGIQNPEMCLYCEKVGEQP TLQLKEQKIMDLYGQPEPVKPFLFYRAKTGRTSTLESVAFPDWFIASSKRDQPIILTSELGKSYNTAFELNINDDYKDDD DKHHH (SEQ ID NO 19),

MMCKPITGTINDLNQQVWTLQGQNLVAVPRSDSVTPVTVAVITCKYPEALEQGRGDPIYLGIQNPEMCLYCEKVGEQ PTLQLKEQKIMDLYGQPEPVKPFLFYRAKTGRTSTLESVAFPDWFIASSKRDQPIILTSELGKSYNTAFELNIND (SEQ ID NO 20) y

MMCKPITGTINDLNQQVWTLQGQNLVAVPRSDSVTPVTVAVITCKYPEALEQGRGDPIYLGIQNPEMCLYCEKVGEQ PTLQLKEQKIMDLYGQPEPVKPFLFYRAKTGRTSTLESVAFPDWFIASSKRDQPIILTSELGKSYNTAFELNINDDYKDD DDKHHH (SEQ ID NO 21).

En otra realización, se proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido de IL-1F9 aislado de la invención. En otro aspecto de la invención, se proporciona un vector recombinante que dirige la expresión de un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de IL-1F9 aislado de la invención. En una realización particular, el vector comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en:

TCAATGTGTAAACCTATTACTGGGACTATTAATGATTTGAATCAGCAAGTGTGGACCCTTCAGGGTCAGAACCTT GTGGCAGTTCCACGAAGTGACAGTGTGACCCCAGTCACTGTTGCTGTTATCACATGCAAGTATCCAGAGGCTCT TGAGCAAGGCAGAGGGGATCCCATTTATTTGGGAATCCAGAATCCAGAAATGTGTTTGTATTGTGAGAAGGTTG GAGAACAGCCCACATTGCAGCTAAAAGAGCAGAAGATCATGGATCTGTATGGCCAACCCGAGCCCGTGAAACCC TTCCTTTTCTACCGTGCCAAGACTGGTAGGACCTCCACCCTTGAGTCTGTGGCCTTCCCGGACTGGTTCATTGC CTCCTCCAAGAGAGACCAGCCCATCATTCTGACTTCAGAACTTGGGAAGTCATACAACACTGCCTTTGAATTAAA TATAAATGACTAA (SEQ ID NO 75),

ATGTCAATGTGTAAACCTATTACTGGGACTATTAATGATTTGAATCAGCAAGTGTGGACCCTTCAGGGTCAGAAC CTTGTGGCAGTTCCACGAAGTGACAGTGTGACCCCAGTCACTGTTGCTGTTATCACATGCAAGTATCCAGAGGC TCTTGAGCAAGGCAGAGGGGATCCCATTTATTTGGGAATCCAGAATCCAGAAATGTGTTTGTATTGTGAGAAGGT TGGAGAACAGCCCACATTGCAGCTAAAAGAGCAGAAGATCATGGATCTGTATGGCCAACCCGAGCCCGTGAAAC CCTTCCTTTTCTACCGTGCCAAGACTGGTAGGACCTCCACCCTTGAGTCTGTGGCCTTCCCGGACTGGTTCATT GCCTCCTCCAAGAGAGACCAGCCCATCATTCTGACTTCAGAACTTGGGAAGTCATACAACACTGCCTTTGAATTA AATATAAATGACAGATCTGGCAGTTCTGACTACAAGGACGACGACGACAAGGGCAGTTCTCACCATCACCATCA CCACTAG (SEQ ID NO 76) y

ATGATGTGTAAACCTATTACTGGGACTATTAATGATTTGAATCAGCAAGTGTGGACCCTTCAGGGTCAGAACCTT GTGGCAGTTCCACGAAGTGACAGTGTGACCCCAGTCACTGTTGCTGTTATCACATGCAAGTATCCAGAGGCTCT TGAGCAAGGCAGAGGGGATCCCATTTATTTGGGAATCCAGAATCCAGAAATGTGTTTGTATTGTGAGAAGGTTG GAGAACAGCCCACATTGCAGCTAAAAGAGCAGAAGATCATGGATCTGTATGGCCAACCCGAGCCCGTGAAACCC TTCCTTTTCTACCGTGCCAAGACTGGTAGGACCTCCACCCTTGAGTCTGTGGCCTTCCCGGACTGGTTCATTGC CTCCTCCAAGAGAGACCAGCCCATCATTCTGACTTCAGAACTTGGGAAGTCATACAACACTGCCTTTGAATTAAA

TATAAATGACAGATCTGGCAGTTCTGACTACAAGGACGACGACGACAAGGGCAGTTCTCACCATCACCATCACC ACTAG (SEQ ID NO 77). En otro aspecto, se proporciona una célula huésped transfectada o transducida con un vector recombinante que dirige la expresión de un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de IL-1F9 de la invención. En otro aspecto, se proporciona un método de producción de un polipéptido de IL-1F9 aislado de la invención que comprende cultivar la célula huésped transfectada o transducida con un vector recombinante que dirige la expresión de un polipéptido de IL-1F9 de la invención, en condiciones que promueven la expresión y aislar el polipéptido de IL-1F9 expresado.

En otro aspecto, se proporciona una composición, particularmente una composición farmacéutica, que comprende un polipéptido de IL-1F9 de la invención y un diluyente, excipiente o portador fisiológicamente aceptable. Se proporciona un método de estimulación del sistema inmunitario de un sujeto inmunosuprimido, que comprende administrar el polipéptido de IL-1F9 según la invención a un sujeto inmunosuprimido en una cantidad suficiente para estimular el sistema inmunitario del sujeto.

Se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a IL-1F9, en el que IL-1F9 puede ser una IL-1F9 de longitud completa o una versión de truncamiento de IL-1F9 de longitud completa, e impide la escisión proteolítica de la misma, particularmente la escisión proteolítica para dar una forma más activa en la que la actividad está con relación a la de la IL-1F9 de longitud completa. También se proporciona un anticuerpo que se une a un polipéptido de IL-1F9 de la invención, e impide la activación/transducción de señales a través de IL-1FRrp2. En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une a un polipéptido de IL-1F9 seleccionado del grupo que consiste en: SEQ ID NO 18, SEQ ID NO 19, SEQ ID NO 20 y SEQ ID NO 21. En algunas realizaciones, el anticuerpo contra IL-1F9, es un anticuerpo monoclonal, particularmente un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo totalmente humano. La invención proporciona una composición, particularmente una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo contra IL-1F9 de la invención y un diluyente, excipiente o portador fisiológicamente aceptable.

La invención también proporciona, un método de tratamiento de un estado inflamatorio o autoinmunitario mediado por IL-1Rrp2, que comprende administrar el anticuerpo contra IL-1F9 de la invención a un sujeto en una cantidad suficiente para mejorar al menos un síntoma mediado por IL-1Rrp2 del estado. En una realización, el estado que va a tratarse es un estado inflamatorio de la piel, los pulmones o las vías respiratorias mediado por IL-1Rrp2. En una realización particular, el estado que va a tratarse se selecciona del grupo que consiste en psoriasis, dermatitis seborreica, dermatitis atópica, incluyendo dermatitis atópica crónica, dermatitis de contacto alérgica, liquen simple crónico, pitiriasis rubra pilaris, dermatitis numular, asma, rinitis alérgica, enfermedad por reflujo gastroesofágico, estados artríticos incluyendo, artritis reumatoide, artritis psoriásica y osteoartritis. En realizaciones particulares de los métodos anteriores, el sujeto es un ser humano.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método de identificación de una proteasa que escinde un miembro de la familia de IL-1 que comprende poner en contacto una fuente de la proteasa con el miembro de la familia de IL-1 en condiciones que promueven la escisión proteolítica del miembro de la familia de IL-1, y determinar si el miembro de la familia de IL-1 se ha escindido proteolíticamente. La invención proporciona además un método de identificación de un inhibidor de una proteasa que escinde un miembro de la familia de IL-1 que comprende poner en contacto la proteasa con el miembro de la familia de IL-1 en presencia, y ausencia, de una molécula que es un inhibidor potencial, en condiciones que promueven la escisión proteolítica del miembro de la familia de IL-1, y determinar si el miembro de la familia de IL-1 se ha escindido proteolíticamente, en el que si el miembro de la familia de IL-1 no se escinde o se escinde en menor grado en presencia de la molécula, la molécula es un inhibidor.

Descripción detallada

La presente invención proporciona composiciones, kits y métodos relacionados con miembros de la familia de IL-1 que requieren IL-1Rrp2 para la señalización o inhiben la señalización mediante competencia con miembros de la familia de IL-1 que requieren IL-1Rrp2 para la señalización (a continuación en el presente documento "polipéptidos que requieren IL-1Rrp2", por ejemplo, IL-1F5, F6, F8 y F9). También se proporcionan ácidos nucleicos, y derivados y fragmentos de los mismos, que codifican para tales miembros de la familia de IL-1. La invención proporciona además proteínas de unión a antígeno que se unen a estos miembros de la familia de IL-1. Los métodos proporcionados incluyen, por ejemplo, métodos de identificación de y/o aislamiento de una proteasa que escinde un miembro de la familia de IL-1 de este tipo, métodos de preparación, identificación o aislamiento de moléculas que modulan la interacción entre un miembro de la familia de IL-1 que requiere IL-1Rrp2 y una proteasa, métodos de identificación de otros miembros de la familia de IL-1 que interaccionan con IL-1Rrp2 y métodos de identificación de otros miembros de la familia de IL-1R que interaccionan con IL-1F5, F6, F8 y /o F9.

La invención también proporciona polipéptidos que requieren IL-1Rrp2 que tienen de manera reproducible altos niveles de actividad biológica como resultado de la conformación de la parte amino-terminal del polipéptido. Tal como se muestra en la figura 1, hay una secuencia (Met o Ile)-Xaa-Asp presente en cada uno de los miembros de la familia de IL-1 que se sabe que requieren IL-1Rrp2 para la señalización (IL-1F5, F6, F8 y F9), que se marca mediante el subrayado de los residuos Met/Ile y Asp. Un polipéptido que requiere IL-1Rrp2 que tiene un extremo N-terminal nueve residuos en el sentido de 5' con respecto a Met/Ile es sumamente activo, mientras que un polipéptido que requiere IL-1Rrp2 que se extiende adicionalmente en el sentido de 5' es escasamente activo. Los polipéptidos

que requieren IL-1Rrp2 que tienen un extremo N-terminal ocho o siete residuos en el sentido de 5' con respecto a Met/Ile son escasamente activos o inactivos. Además, el aminoácido exacto presente en el extremo N-terminal de los polipéptidos que requieren IL-1Rrp2 no parece ser importante. Se prepararon varios polipéptidos, algunos de los cuales tenían una Met N-terminal inicialmente, eliminándose por escisión la Met N-terminal mediante una metionil aminopeptidasa intracelular para algunos polipéptidos; para otros (aquéllos con residuos voluminosos de manera C-terminal con respecto a la Met) la aminopeptidasa no pudo eliminar la metionina y para otros, se prepararon polipéptidos sin una Met N-terminal tal como se describe en el ejemplo 1 a continuación.

Se indican las secuencias de polinucleótido y polipéptido descritas en el presente documento usando abreviaturas de una o tres letras convencionales. A menos que se indique lo contrario, cada secuencia de polipéptido tiene un extremo amino-terminal a la izquierda y un extremo carboxilo-terminal a la derecha; cada secuencia de ácido nucleico monocatenaria, y la cadena superior de cada secuencia de ácido nucleico bicatenaria, tiene un extremo terminal 5' a la izquierda y un extremo terminal 3' a la derecha. Una secuencia de polipéptido o polinucleótido particular también puede describirse explicando cómo se diferencia de una secuencia de referencia.

A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tendrán los significados que se entienden comúnmente por los expertos habituales en la técnica. Además, a menos que se requiera lo contrario por el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. En general, las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química e hibridación de proteínas y ácidos nucleicos descritas en el presente documento son aquéllas que se conocen bien y se usan comúnmente en la técnica. Los métodos y las técnicas de la presente invención se realizan en general según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y tal como se describen en diversa bibliografía general y más específica que se cita y comenta en la totalidad de la presente memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario. Véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), y Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), que se incorporan al presente documento como referencia. Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se realizan según las especificaciones del fabricante, tal como se realiza comúnmente en la técnica o tal como se describe en el presente documento. La terminología usada en relación con, y los procedimientos y las técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica de síntesis, y química médica y farmacéutica descritos en el presente documento son aquéllos que se conocen bien y se usan comúnmente en la técnica. Pueden usarse técnicas convencionales para las síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración y tratamiento de pacientes.

Los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, se entenderá que tienen los siguientes significados:

El término "molécula aislada" (en la que la molécula es, por ejemplo, un polipéptido, un polinucleótido o un anticuerpo) es una molécula que en virtud de su origen o fuente de derivación (1) no está asociada con los componentes asociados de manera natural que le acompañan en su estado nativo, (2) está sustancialmente libre de otras moléculas de la misma especie (3) se expresa por una célula de una especie diferente, o (4) no se produce en la naturaleza. Por tanto, una molécula que se sintetiza químicamente, o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula a partir de la que se origina de manera natural, estará "aislada" de sus componentes asociados de manera natural. Una molécula también puede hacerse que esté sustancialmente libre de componentes asociados de manera natural mediante aislamiento, usando técnicas de purificación bien conocidas en la técnica. Puede someterse a ensayo la homogeneidad o pureza de la molécula mediante varios medios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede someterse a ensayo la pureza de una muestra de polipéptido usando electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción del gel para visualizar el polipéptido usando técnicas bien conocidas en la técnica. Para determinados fines, puede proporcionarse mayor resolución usando HPLC u otros medios bien conocidos en la técnica para purificación.

Los términos "inhibidor de IL-1Rrp2" y "antagonista de IL-1Rrp2" se usan de manera intercambiable. Cada uno es una molécula que inhibe de manera detectable al menos una función de IL-1Rrp2. A la inversa, un "agonista de IL-1Rrp2" es una molécula que aumenta de manera detectable al menos una función de IL-1Rrp2. La inhibición provocada por un inhibidor de IL-1Rrp2 no es necesario que sea completa siempre que sea detectable usando un ensayo. Puede usarse cualquier ensayo de una función de IL-1Rrp2, de lo que se proporcionan ejemplos en el presente documento. Los ejemplos de funciones de IL-1Rrp2 que pueden inhibirse por un inhibidor de IL-1Rrp2, o provocarse o aumentarse por un agonista de IL-1Rrp2, incluyen la activación de rutas de señalización de NFkB; la activación de MAP cinasas (Erk, JNK, p38) y sus rutas de señalización; la inducción de citocinas; la inducción de quimiocinas; el reclutamiento de neutrófilos; la potenciación del grosor de la piel (por ejemplo, inducción de acantosis y/o hiperqueratosis que se asemeja a la que se encuentra en la piel con psoriasis), la señalización en el sentido de 3', etcétera. Los ejemplos de tipos de inhibidores de IL-1Rrp2 y agonistas de IL-1Rrp2 incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos que requieren IL-1Rrp2 tales como determinados miembros de la familia de IL-1 (por ejemplo, IL-1F6, F8 y F9, que son agonistas de IL-1Rrp2, e IL-1F5, que es un antagonista de IL-1Rrp2), anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, y derivados de anticuerpos (por ejemplo, un anticuerpo que se une a un agonista de IL-1Rrp2 e impide la escisión proteolítica del mismo).

Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se refieren cada uno a una molécula que comprende dos o más residuos de aminoácido unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Estos términos abarcan, por ejemplo, proteínas nativas y artificiales, fragmentos de proteína y análogos de polipéptido (tales como muteínas, variantes y proteínas de fusión) de una secuencia de proteína así como proteínas modificadas de manera postraduccional, o sino de manera covalente o no covalente. Un péptido, polipéptido o proteína puede ser monomérico o polimérico.

El término "fragmento de polipéptido" tal como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que tiene una deleción amino-terminal y/o carboxi-terminal en comparación con una proteína de longitud completa correspondiente. Los fragmentos pueden ser de, por ejemplo, al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 50, 70, 80, 90, 100, 150 ó 200 aminoácidos de longitud. Los fragmentos también pueden ser de, por ejemplo, como máximo 1.000, 750, 500, 250, 200, 175, 150, 125, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 14, 13, 12, 11 ó 10 aminoácidos de longitud. Un fragmento puede comprender además, en cualquiera o en ambos de sus extremos, uno o más aminoácidos adicionales, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de una proteína que se produce de manera natural diferente (por ejemplo, un dominio Fc o de cremallera de leucina) o una secuencia de aminoácidos artificial (por ejemplo, una secuencia ligadora o una proteína de etiqueta artificial).

Los polipéptidos de la invención incluyen polipéptidos que se han modificado de alguna manera y por cualquier motivo, por ejemplo, para: (1) reducir la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducir la susceptibilidad a la oxidación, (3) alterar la afinidad de unión para formar complejos proteicos, (4) alterar afinidades de unión, y (4) conferir o modificar otras propiedades fisicoquímicas o funcionales. Los análogos incluyen muteínas de un polipéptido. Por ejemplo, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservativas) en la secuencia que se produce de manera natural (por ejemplo, en la parte del polipéptido fuera del/de los dominio(s) que forma(n) contactos intermoleculares. Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una que no cambia sustancialmente las características estructurales de la secuencia original (por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no tiende a romper una hélice que se produce en la secuencia original, ni a perturbar otros tipos de estructura secundaria que caracterizan la secuencia original o son necesarios para su funcionalidad). Se describen ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptido 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, eds., Garland Publishing, Nueva York, N. Y. (1991)); y Thornton *et al.* Nature 354:105 (1991), que se incorporan cada uno al presente documento como referencia.

La presente descripción también proporciona análogos no peptídicos de polipéptidos que requieren IL-IL-1Rrp2. Se usan comúnmente análogos no peptídicos en la industria farmacéutica como fármacos con propiedades análogas a las del péptido molde. Estos tipos de compuesto no peptídico se denominan "miméticos de péptidos" o "peptidomiméticos", véanse, por ejemplo, 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), que se incorporan al presente documento como referencia. Los miméticos de péptidos que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles pueden usarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. En general, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica deseada), tal como un anticuerpo humano, pero tiene una o más uniones peptídicas reemplazadas opcionalmente por una unión seleccionada del grupo que consiste en: $-CH_2NH-$, $-CH_2S-$, $-CH_2-CH_2-$, $-CH=CH-$(cis y trans), $-COCH_2-$, $-CH(OH)CH_2-$ y $-CH_2SO-$, mediante métodos bien conocidos en la técnica. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso por un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) también puede usarse para generar péptidos más estables. Además, pueden generarse péptidos constreñidos que comprenden una secuencia consenso o una variación de secuencia consenso sustancialmente idéntica mediante métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992), incorporado al presente documento como referencia), por ejemplo, añadiendo residuos de cisteína internos que pueden formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

Una "variante" de un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o más residuos de aminoácido se insertan en, se delecionan de y/o se sustituyen en la secuencia de aminoácidos con relación a otra secuencia de polipéptido. Las variantes de la invención incluyen proteínas de fusión.

Un "derivado" de un polipéptido es un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) que se ha modificado químicamente, por ejemplo, mediante conjugación a otro resto químico (tal como, por ejemplo, polietilenglicol o albúmina, por ejemplo, albúmina sérica humana), fosforilación y glicosilación. A menos que se indique lo contrario, el término "anticuerpo" incluye, además de anticuerpos que comprenden dos cadenas pesadas de longitud completa y dos cadenas ligeras de longitud completa, derivados, variantes, fragmentos, y muteínas de los mismos, de los que se describen ejemplos a continuación.

Una "proteína de unión a antígeno" es una proteína que comprende una parte que se une a un antígeno y, opcionalmente, una parte de andamiaje o armazón que permite que la parte de unión a antígeno adopte una conformación que promueve la unión de la proteína de unión a antígeno al antígeno. Los ejemplos de proteínas de unión a antígeno incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, una parte de unión a antígeno de un anticuerpo), derivados de anticuerpos y análogos de anticuerpos. La proteína de unión a antígeno puede comprender, por ejemplo, un andamiaje proteico alternativo o andamiaje artificial con una o más regiones de

determinación de complementariedad (CDR) o derivados de CDR injertados. Tales andamiajes incluyen, pero no se limitan a, andamiajes derivados de anticuerpos que comprenden mutaciones introducidas para, por ejemplo, estabilizar la estructura tridimensional de la proteína de unión a antígeno así como andamiajes completamente sintéticos que comprenden, por ejemplo, un polímero biocompatible. Véanse, por ejemplo, Korndorfer *et al.*, 2003, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, Volumen 53, Número 1:121-129; Roque *et al.*, 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654. Además, pueden usarse miméticos de anticuerpos peptídicos ("PAM"), así como andamiajes basados en miméticos de anticuerpos que utilizan componentes de unión con fibronectina como andamiaje.

Una proteína de unión a antígeno puede tener, por ejemplo, la estructura de una inmunoglobulina que se produce de manera natural. Una "inmunoglobulina" es una molécula tetramérica. En una inmunoglobulina que se produce de manera natural, cada tetrámero se compone de dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, teniendo cada par una cadena "ligera" (de aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (de aproximadamente 50-70 kDa). La parte amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento de antígenos. La parte carboxi-terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes se unen mediante una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase en general, Fundamental Immunology Cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (incorporado como referencia en su totalidad para todos los fines). Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman la región de unión del anticuerpo de manera que una inmunoglobulina intacta tiene dos sitios de unión.

Las cadenas de inmunoglobulina presentan la misma estructura general de regiones de entramado (FR, *framework*) relativamente conservadas unidas mediante tres regiones hipervariables, también denominadas regiones de determinación de complementariedad o CDR. Desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, tanto las cadenas ligeras como pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es según las definiciones de Kabat *et al.* en Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, PHS, NIH, publicación NIH n.º 91-3242, 1991.

Los anticuerpos pueden obtenerse de fuentes tales como suero o plasma que contienen inmunoglobulinas que tienen una especificidad antigénica variada. Si tales anticuerpos se someten a purificación por afinidad, pueden enriquecerse para una especificidad antigénica particular. Tales preparaciones de anticuerpos enriquecidas consisten a menudo en menos de aproximadamente el 10% de anticuerpo que tiene actividad de unión específica para el antígeno particular. El porcentaje de anticuerpo específico de antígeno puede aumentarse usando múltiples etapas de purificación. Los anticuerpos que se enriquecen mediante purificación por afinidad usando el antígeno se denominan a menudo "monoespecíficos".

Un "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina intacta o a una parte de unión a antígeno de la misma que compite con el anticuerpo intacto para una unión específica, a menos que se especifique lo contrario. Pueden producirse partes de unión a antígeno mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Las partes de unión a antígeno incluyen, entre otros, fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, anticuerpos de dominios (dAc) y de CDR, anticuerpos de cadena sencilla (scFv), anticuerpos quiméricos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, y polipéptidos que contienen al menos una parte de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión a antígeno específica al polipéptido.

Pueden identificarse regiones de determinación de complementariedad (CDR) y regiones de entramado (FR) de un anticuerpo dado usando el sistema descrito por Kabat *et al.* en Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, PHS, NIH, publicación NIH n.º 91-3242, 1991. Una o más CDR pueden incorporarse en una molécula o bien de manera covalente o bien de manera no covalente para hacer que sea una proteína de unión a antígeno. Una proteína de unión a antígeno puede incorporar la(s) CDR(s) como parte de una cadena de polipéptido más grande, puede unir de manera covalente la(s) CDR(s) a otra cadena de polipéptido, o puede incorporar la(s) CDR(s) de manera no covalente. Las CDR permiten que la proteína de unión a antígeno se una específicamente a un antígeno de interés particular.

Una proteína de unión a antígeno puede tener uno o más sitios de unión. Si hay más de un sitio de unión, los sitios de unión pueden ser idénticos entre sí o pueden ser diferentes. Por ejemplo, una inmunoglobulina humana que se produce de manera natural normalmente tiene dos sitios de unión idénticos, mientras que un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" tiene dos sitios de unión diferentes.

El término "anticuerpo humano" incluye todos los anticuerpos que tienen una o más regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. En una realización, todos los dominios variables y constantes se derivan de secuencias de inmunoglobulina humana (un anticuerpo totalmente humano). Estos anticuerpos pueden prepararse de una variedad de maneras, de las que se describen ejemplos a continuación, incluyendo a través de la inmunización con un antígeno de interés de un ratón que se modifica genéticamente para expresar anticuerpos derivados de genes que codifican para cadenas pesadas y/o ligeras humanas.

Un "anticuerpo humanizado" tiene una secuencia que se diferencia de la secuencia de un anticuerpo derivado de una especie no humana en una o más sustituciones, deleciones y/o adiciones de aminoácido, de manera que es poco probable que el anticuerpo humanizado induzca una respuesta inmunitaria, y/o induzca una respuesta inmunitaria menos intensa, en comparación con el anticuerpo de la especie no humana, cuando se administra a un sujeto humano. En una realización, determinados aminoácidos en los dominios constantes y región de entramado de las cadenas pesadas y/o ligeras del anticuerpo de la especie no humana se mutan para producir el anticuerpo humanizado. En otra realización, el/los dominio(s) constante(s) de un anticuerpo humano se fusionan al/a los dominio(s) variable(s) de una especie no humana. En otra realización, uno o más residuos de aminoácido en una o más secuencias de CDR de un anticuerpo no humano se cambian para reducir la probable inmunogenicidad del anticuerpo no humano cuando se administra a un sujeto humano, en el que los residuos de aminoácido cambiados o bien no son críticos para la unión inmunoespecífica del anticuerpo a su antígeno, o bien los cambios en la secuencia de aminoácidos que se realizan son cambios conservativos, de manera que la unión del anticuerpo humanizado al antígeno no es significativamente peor que la unión del anticuerpo no humano al antígeno. Pueden hallarse ejemplos de cómo preparar anticuerpos humanizados en las patentes estadounidenses n.ºs 6.054.297, 5.886.152 y 5.877.293.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que contiene una o más regiones de un anticuerpo y una o más regiones de uno o más de otros anticuerpos. En un ejemplo de un anticuerpo quimérico, una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a, homóloga a, o se deriva de un anticuerpo de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es/son idéntica(s) a, homóloga(s) a, o se deriva(n) de un anticuerpo(s) de otra especie o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpos. También están incluidos los fragmentos de tales anticuerpos que presentan la actividad biológica deseada (es decir, la capacidad para unirse específicamente a un miembro de la familia de IL-1). Véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.816.567 y Morrison, 1985, Science 229:1202-07.

Un "anticuerpo neutralizante" o "un anticuerpo inhibidor" es un anticuerpo que inhibe la activación proteolítica de un miembro de la familia de IL-1 cuando un exceso del anticuerpo anti-miembro de la familia de IL-1 reduce la cantidad de activación en al menos aproximadamente el 20% usando un ensayo tal como los descritos en el presente documento en los ejemplos. En diversas realizaciones, el anticuerpo reduce la cantidad de cantidad de activación proteolítica de un miembro de la familia de IL-1 en al menos el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% y el 99,9%.

Pueden prepararse fácilmente fragmentos o análogos de anticuerpos por los expertos habituales en la técnica a partir de las enseñanzas de esta memoria descriptiva y usando técnicas bien conocidas en la técnica. Los extremos amino y carboxi-terminal preferidos de los fragmentos o análogos aparecen cerca de los límites de dominios funcionales. Pueden identificarse dominios estructurales y funcionales mediante comparación de datos de secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos con bases de datos de secuencias públicas o privadas. Pueden usarse métodos de comparación computerizada para identificar motivos de secuencia o dominios de conformación de proteínas predichos que aparecen en otras proteínas de estructura y/o función conocidas. Se conocen métodos para identificar secuencias de proteína que se pliegan en una estructura tridimensional conocida. Véase, por ejemplo, Bowie *et al*, 1991, Science 253:164.

Un "anticuerpo injertado con CDR" es un anticuerpo que comprende una o más CDR derivadas de un anticuerpo de una especie o isotipo particular y la región de entramado de otro anticuerpo de la misma o diferente especie o isotipo.

Un "anticuerpo multiespecífico" es un anticuerpo que reconoce más de un epítopo en uno o más antígenos. Una subclase de este tipo de anticuerpo es un "anticuerpo biespecífico" que reconoce dos epítopos distintos en el mismo antígeno o antígenos diferentes.

Una proteína de unión a antígeno "se une específicamente" a un antígeno (por ejemplo, un miembro de la familia de IL-1 humana) si se une al antígeno con una constante de disociación de 1 nanomolar o menos.

Un "dominio de unión a antígeno", "región de unión a antígeno", o "sitio de unión a antígeno" es una parte de una proteína de unión a antígeno que contiene residuos de aminoácido (u otros restos) que interaccionan con un antígeno y contribuyen a la especificidad y afinidad de la proteína de unión a antígeno por el antígeno. Para un anticuerpo que se une específicamente a su antígeno, esto incluirá al menos parte de al menos uno de sus dominios de CDR.

Un "epítopo" es la parte de una molécula que se une por una proteína de unión a antígeno (por ejemplo, por un anticuerpo). Un epítopo puede comprender partes no contiguas de la molécula (por ejemplo, en un polipéptido, residuos de aminoácido que no son contiguos en la secuencia primaria del polipéptido pero que, en el contexto de la estructura terciaria y cuaternaria del polipéptido, están lo suficientemente cerca entre sí para unirse por una proteína de unión a antígeno).

El "porcentaje de identidad" de dos secuencias de polinucleótido o de polipéptido se determina comparando las secuencias usando el programa informático GAP (una parte del paquete GCG Wisconsin, versión 10.3 (Accelrys,

San Diego, CA)) usando sus parámetros por defecto.

Los términos "polinucleótido", "oligonucleótido" y "ácido nucleico" se usan de manera intercambiable en la totalidad del documento e incluyen moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), análogos del ADN o ARN generado usando análogos de nucleótidos (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos y análogos de nucleótidos que no se producen de manera natural), e híbridos de los mismos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria. En una realización, las moléculas de ácido nucleico de la invención comprenden un marco de lectura abierta contiguo que codifica para un anticuerpo, o un fragmento, derivado, muteína, o variante del mismo, de la invención.

Dos polinucleótidos monocatenarios son "el complemento" uno de otro si sus secuencias pueden alinearse en una orientación antiparalela de manera que cada nucleótido en un polinucleótido esté opuesto a su nucleótido complementario en el otro polinucleótido, sin la introducción de huecos, y sin nucleótidos no apareados en el extremo 5' o 3' de ninguna secuencia. Un polinucleótido es "complementario" a otro polinucleótido si los dos polinucleótidos pueden hibridarse entre sí en condiciones moderadamente rigurosas. Por tanto, un polinucleótido puede ser complementario a otro polinucleótido sin ser su complemento.

Un "vector" es un ácido nucleico que puede usarse para introducir otro ácido nucleico unido al mismo en una célula. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a una molécula de ADN bicatenaria lineal o circular en la que pueden ligarse segmentos de ácido nucleico adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral (por ejemplo, adenovirus, virus adenoasociados y retrovirus defectuosos para la replicación), en el que pueden introducirse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Determinados vectores pueden dar replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que comprenden un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) se integran en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y se replican de ese modo junto con el genoma del huésped. Un "vector de expresión" es un tipo de vector que puede dirigir la expresión de un polinucleótido elegido.

Una secuencia de nucleótidos está "unida operativamente" a una secuencia reguladora si la secuencia reguladora afecta a la expresión (por ejemplo, el nivel, el momento o la ubicación de la expresión) de la secuencia de nucleótidos. Una "secuencia reguladora" es un ácido nucleico que afecta a la expresión (por ejemplo, el nivel, el momento o la ubicación de la expresión) de un ácido nucleico al que está unida operativamente. La secuencia reguladora puede ejercer, por ejemplo, sus efectos directamente sobre el ácido nucleico regulado, o a través de la acción de una o más de otras moléculas (por ejemplo, polipéptidos que se unen a la secuencia reguladora y/o el ácido nucleico). Ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Se describen ejemplos adicionales de secuencias reguladoras, por ejemplo, en Goeddel, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA y Baron *et al*, 1995, Nucleic Acids Res. 23:3605-06.

Una "célula huésped" es una célula que puede usarse para expresar un ácido nucleico, por ejemplo, un ácido nucleico de la invención. Una célula huésped puede ser una procariota, por ejemplo, *E. coli*, o también puede ser una eucariota, por ejemplo, una eucariota de una sola célula (por ejemplo, una levadura u otro hongo), una célula vegetal (por ejemplo, una célula vegetal de tabaco o tomate), una célula animal (por ejemplo, una célula humana, una célula de mono, una célula de hámster, una célula de rata, una célula de ratón o una célula de insecto) o un hibridoma. Los ejemplos de células huésped incluyen la línea COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (véase Gluzman *et al*, 1981, Cell 23:175), células L, células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovario de hámster chino (CHO) o sus derivados tales como las líneas celulares Veggie CHO y relacionadas que se hacen crecer en medios libres de suero (véase Rasmussen *et al*, 1998, Cytotechnology 28:31) o la cepa de CHO DX-B11, que es deficiente en DHFR (véase Urlaub *et al*, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-20), células HeLa, líneas celulares BHK (ATCC CRL 10), la línea celular CV1/EBNA derivada de la línea celular de riñón de mono verde africano CV1 (ATCC CCL 70) (véase McMahan *et al*, 1991, EMBO J. 10:2821), células de riñón embrionario humano tales como 293, 293 EBNA o MSR 293, células A431 epidérmicas humanas, células Colo205 humanas, otras líneas celulares de primates transformadas, células diploides normales, cepas celulares derivadas de cultivo *in vitro* de tejido primario, explantes primarios, células HL-60, U937, HaK o Jurkat. Normalmente, una célula huésped es una célula cultivada que puede transformarse o transfectarse con un ácido nucleico que codifica para polipéptido, que puede expresarse entonces en la célula huésped. La expresión "célula huésped recombinante" puede usarse para indicar una célula huésped que se ha transformado o transfectado con un ácido nucleico que va a expresarse. Una célula huésped también puede ser una célula que comprende el ácido nucleico pero que no lo expresa a un nivel deseado a menos que se introduzca una secuencia reguladora en la célula huésped de manera que se una operativamente con el ácido nucleico. Se entiende que el término célula huésped se refiere no sólo a la células objeto particular sino también a la progenie o posible progenie de una célula de este tipo. Debido a que pueden producirse determinadas modificaciones en generaciones sucesivas debido a, por ejemplo, mutación o influencia ambiental, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula original, pero están incluidas todavía dentro del alcance del término tal como se usa en el presente documento.

<u>Miembros de la familia de IL-1 que requieren IL-1Rrp2</u>

En un aspecto, la presente invención proporciona proteínas (por ejemplo, miembros de la familia de IL-1, derivados, muteínas y variantes de los mismos) que requieren IL-1Rrp2 para la señalización, por ejemplo, IL-1F5, F6, F8 y F9 humanas. Los miembros de la familia de IL-1 según la presente invención incluyen proteínas que inhiben una actividad biológica de IL-1Rrp2, así como proteínas que estimulan una actividad biológica de IL-1Rrp2. Los ejemplos de tales actividades biológicas incluyen la activación de rutas de cinasas múltiples, incluyendo ERK, p38MAPK, JNK, e IKK. En la piel, la señalización de IL-1Rrp2 puede conducir a una epidermis con acantosis, hiperqueratosis que se asemeja a la piel con psoriasis, y en el pulmón provoca el reclutamiento de neutrófilos.

Diferentes miembros de la familia de IL-1 pueden utilizar diferentes dominios de IL-1Rrp2 para la señalización, o actuar mediante diferentes mecanismos de acción. Los ejemplos incluyen pero no se limitan a proteínas que provocan la transducción de señales a través de IL-1Rrp2, y proteínas que inhiben la transducción de señales. El sitio de acción puede ser por ejemplo, intracelular (por ejemplo, interfiriendo en una cascada de señalización intracelular) o extracelular. No es necesario que una proteína antagonista inhiba por completo la actividad de IL-1Rrp2 para encontrar uso en la presente invención; más bien, también se contemplan proteínas antagonistas que reducen una actividad particular de IL-1Rrp2 para su uso. Los comentarios en el presente documento de mecanismos de acción particulares para proteínas antagonistas en el tratamiento de enfermedades particulares son únicamente ilustrativos, y los métodos presentados en el presente documento no están vinculados de ese modo.

Otros derivados de los miembros de la familia de IL-1 dentro del alcance de esta invención incluyen conjugados covalentes o agregativos de las proteínas, o fragmentos de los mismos, con otras proteínas o polipéptidos, tales como mediante expresión de proteínas de fusión recombinantes que comprenden polipéptidos heterólogos fusionados al extremo N-terminal o el extremo C-terminal de una proteína que requiere IL-1Rrp2. Por ejemplo, el péptido conjugado puede ser un polipéptido señal (o líder) heterólogo, por ejemplo, la secuencia líder de factor alfa de levadura, o un péptido tal como una etiqueta epitópica. Las proteínas de fusión que contienen proteína que requiere IL-1Rrp2 pueden comprender péptidos añadidos para facilitar la purificación o identificación de polipéptidos que requieren IL-1Rrp2 (por ejemplo, poli-His). Un polipéptido que requiere IL-1Rrp2 también puede unirse al péptido FLAG® (DYKDDDDK; SEQ ID NO: 5), descrito en Hopp *et al.*, Bio/Technology 6:1204, 1988, y la patente estadounidense n.º 5.011.912. El péptido FLAG es sumamente antigénico y proporciona un epítopo unido reversiblemente por un anticuerpo monoclonal (Acm) específico, que permite un ensayo rápido y una purificación fácil de proteína recombinante expresada. Los reactivos útiles para preparar proteínas de fusión en las que se fusiona el péptido FLAG a un polipéptido dado están disponibles comercialmente (Sigma, St. Louis, MO).

Proteínas de etiqueta útiles adicionales incluyen la proteína fluorescente verde (GFP; Chalfie *et al.*, Science 263:802, 1994), un péptido N-terminal que contiene sitios de reconocimiento para un anticuerpo monoclonal, una endopeptidasa específica y una proteína cinasa específica del sitio (PKA; Blanar y Rutter, Science 256:1014, 1992), birA (Airman *et al.*, Science 274:94, 1996) y glutatión S transferasa (GST: Smith y Johnson, Gene 67:31, 1988).

Los oligómeros que contienen una o más proteínas que requieren IL-1Rrp2 pueden emplearse como agonistas o antagonistas. Los oligómeros pueden estar en forma de dímeros, trímeros u oligómeros superiores unidos de manera covalente o unidos de manera no covalente. Se contemplan para su uso los oligómeros que comprenden dos o más proteínas que requieren IL-1Rrp2, siendo un ejemplo un homodímero. Otros oligómeros incluyen heterodímeros, homotrímeros, heterotrímeros, homotetrámeros, heterotetrámeros, etc.

Una realización se refiere a oligómeros que comprenden múltiples proteínas que requieren IL-1Rrp2 unidas a través de interacciones covalentes o no covalentes entre restos peptídicos fusionados a las proteínas que requieren IL-1Rrp2. Tales péptidos pueden ser ligadores peptídicos (espaciadores), o péptidos que tienen la propiedad de que promueven la oligomerización. Las cremalleras de leucina y determinados polipéptidos derivados de anticuerpos se encuentran entre los péptidos que pueden promover la oligomerización de proteínas que requieren IL-1Rrp2 unidas a los mismos, tal como se describe en más detalle a continuación.

En realizaciones particulares, los oligómeros comprenden desde dos hasta cuatro proteínas que requieren IL-1Rrp2. Las proteínas que requieren IL-1Rrp2 del oligómero pueden estar en cualquier forma, tal como cualquiera de las formas descritas anteriormente, por ejemplo, variantes o fragmentos. Preferiblemente, los oligómeros comprenden proteínas que requieren IL-1Rrp2 que tienen actividad (es decir, actividad antagonista o agonista de IL-1Rrp2).

En una realización, se prepara un oligómero usando polipéptidos derivados de inmunoglobulinas. Se ha descrito la preparación de proteínas de fusión que comprenden determinados polipéptidos heterólogos fusionados a diversas partes de polipéptidos derivados de anticuerpos (incluyendo el dominio Fc), por ejemplo, por Ashkenazi *et al*, 1991, PNAS USA 88:10535; Byrn *et al*, 1990, Nature 344:677; y Hollenbaugh *et al*, 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", en Current Protocols in Immunology, Supl. 4, páginas 10.19.1 – 10.19.11.

Una realización de la presente invención se refiere a un dímero que comprende dos proteínas de fusión creadas fusionando un polipéptido que requiere IL-1Rrp2 o fragmento del mismo a la región Fc de un anticuerpo. El dímero puede prepararse, por ejemplo, insertando una fusión génica que codifica para la proteína de fusión en un vector de expresión apropiado, expresando la fusión génica en células huésped transformadas con el vector de expresión recombinante, y permitiendo que la proteína de fusión expresada se exprese de manera muy similar a moléculas de anticuerpo, con lo cual se forman enlaces disulfuro intercatenarios entre los restos Fc para producir el dímero.

El término "polipéptido Fc" tal como se usa en el presente documento incluye formas nativas y de muteína de polipéptidos derivados de la región Fc de un anticuerpo. También están incluidas las formas truncadas de tales polipéptidos que contienen la región bisagra que promueve la dimerización. Las proteínas de fusión que comprenden restos Fc (y oligómeros formados a partir de los mismos) ofrecen la ventaja de una cromatografía de purificación por afinidad fácil sobre columnas de proteína A o proteína G.

Un polipéptido Fc adecuado, descrito en la solicitud PCT WO 93/10151 (incorporada al presente documento como referencia), es un polipéptido monocatenario que se extiende desde la región bisagra N-terminal hasta el extremo C-terminal nativo de la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano. Otro polipéptido Fc útil es la muteína Fc descrita en la patente estadounidense n.º 5.457.035 y en Baum *et al.*, 1994, EMBO J. 13:3992-4001. La secuencia de aminoácidos de esta muteína es idéntica a la de la secuencia de Fc nativa presentada en el documento WO 93/10151, excepto porque el aminoácido 19 se ha cambiado de Leu a Ala, el aminoácido 20 se ha cambiado de Leu a Glu y el aminoácido 22 se ha cambiado de Gly a Ala. La muteína presenta afinidad reducida por los receptores de Fc.

En otras realizaciones, un polipéptido que requiere IL-1Rrp2 o fragmento del mismo puede sustituirse por la parte variable de una cadena pesada y/o ligera de anticuerpo.

Alternativamente, el oligómero es una proteína de fusión que comprende múltiples proteínas que requieren IL-1Rrp2, con o sin ligadores peptídicos (péptidos espaciadores). Entre los ligadores peptídicos adecuados se encuentran los descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 4.751.180 y 4.935.233.

Otro método para preparar proteínas oligoméricas que requieren IL-1Rrp2 implica el uso de una cremallera de leucina. Los dominios de cremallera de leucina son péptidos que promueven la oligomerización de las proteínas en que las que se encuentran. Las cremalleras de leucina se identificaron originariamente en varias proteínas de unión a ADN (Landschulz *et al*, 1988, Science 240:1759), y se han encontrado desde entonces en una variedad de diferentes proteínas. Entre las cremalleras de leucina conocidas se encuentran péptidos que se producen de manera natural y derivados de los mismos que se dimerizan o trimerizan. Se describen ejemplos de dominios de cremallera de leucina adecuados para producir proteínas oligoméricas solubles en la solicitud PCT WO 94/10308, y los derivados de cremallera de leucina de proteína de surfactante pulmonar D (SPD) descritos en Hoppe *et al*, 1994, FEBS Letters 344:191, incorporados al presente documento como referencia. El uso de una cremallera de leucina modificada que permite la trimerización estable de una proteína heteróloga fusionada a la misma se describe en Fanslow *et al*, 1994, Semin. Immunol. 6:267-78. En un enfoque, proteínas de fusión recombinantes que comprenden una proteína que requiere IL-1Rrp2, fragmento o derivado fusionado a un péptido de cremallera de leucina se expresa en células huésped adecuadas, y se recuperan del sobrenadante de cultivo los fragmentos o derivados de polipéptidos oligoméricos solubles que requieren IL-1Rrp2 que forman.

Proteínas de unión a antígeno

La presente descripción también proporciona proteínas de unión a antígeno que se unen a un polipéptido que requiere IL-1Rrp2 (por ejemplo, un agonista o antagonista de IL-1Rrp2). Se conocen en la técnica numerosos tipos de proteínas de unión a antígeno y métodos de preparación de los mismos. En un aspecto, la presente invención proporciona proteínas de unión a antígeno que interfieren con la activación proteolítica de un polipéptido que requiere IL-1Rrp2. Tales proteínas de unión a antígeno pueden prepararse contra un miembro de la familia de IL-1 tal como IL-1F6, F8 o F9 (o F5), o un fragmento, variante o derivado del mismo, y seleccionarse en ensayos convencionales para determinar la capacidad para interferir con la activación proteolítica de la proteína que requiere IL-1Rrp2.

En otro aspecto, la presente invención incluye una proteína de unión a antígeno que demuestra selectividad de especie, y una proteína de unión a antígeno que tiene una o más de las siguientes características: se une a tanto a proteína que requiere IL-1Rrp2 humana como murina, inhibe la activación proteolítica de proteína que requiere IL-1Rrp2 humana, inhibe la activación proteolítica de proteína que requiere IL-1Rrp2 murina, se une a o cerca del sitio de escisión proteolítica de la proteína que requiere IL-1Rrp2, provoca relativamente poca regulación por disminución de IL-1Rrp2 expresado en la superficie celular.

También están incluidos fragmentos de proteínas de unión a antígeno. Pueden producirse fragmentos de unión a antígeno de proteínas de unión a antígeno de la invención mediante técnicas convencionales. Los ejemplos de tales fragmentos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab y $F(ab')_2$. También se contemplan fragmentos de anticuerpo y derivados producidos mediante técnicas de ingeniería genética.

Descripciones adicionales incluyen anticuerpos quiméricos, por ejemplo, versiones humanizadas de anticuerpos monoclonales no humanos (por ejemplo, murinos). Tales anticuerpos humanizados pueden prepararse mediante técnicas convencionales, y ofrecen la ventaja de una inmunogenicidad reducida cuando los anticuerpos se administran a seres humanos.

También están incluidos anticuerpos humanos o parcialmente humanos preparados en animales no humanos (por ejemplo, ratones en los que uno o más genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado o sustituido por inmunoglobulina humana). Los anticuerpos producidos en el animal incorporan cadenas de polipéptido de inmunoglobulina humana codificadas por el material genético humano introducido en el animal.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona anticuerpos monoclonales que se unen a proteína(s) que requiere(n) IL-1Rrp2. Pueden producirse anticuerpos monoclonales usando cualquier técnica conocida en la técnica, por ejemplo, inmortalizando células de bazo recogidas del animal transgénico tras la finalización del programa de inmunización. Las células de bazo pueden inmortalizarse usando cualquier técnica conocida en la técnica, por ejemplo, fusionándolas con células de mieloma para producir hibridomas.

Los anticuerpos monoclonales secretados por una línea celular de hibridoma pueden purificarse usando cualquier técnica conocida en la técnica. Pueden seleccionarse además hibridomas o Acm para identificar Acm con propiedades particulares, tales como la capacidad para bloquear una actividad inducida por IL-1Rrp2. Se proporcionan ejemplos de tales selecciones en los ejemplos a continuación.

La evolución molecular de las regiones de determinación de complementariedad (CDR) en el centro del sitio de unión a anticuerpo también se ha usado para aislar anticuerpos con aumento de afinidad, por ejemplo, anticuerpos que tienen aumento de afinidad por c-erbB-2, tal como se describe por Schier *et al.*, 1996, J. Mol. Biol. 263:551. Por consiguiente, tales técnicas son útiles en la preparación de anticuerpos frente a proteínas que requieren IL-1Rrp2.

Pueden prepararse proteínas de unión a antígeno mediante cualquier de varias técnicas convencionales. Por ejemplo, pueden purificarse de células que las expresan de manera natural (por ejemplo, puede purificarse un anticuerpo a partir de un hibridoma que lo produce), o producirse en sistemas de expresión recombinante, usando cualquier técnica conocida en la técnica. Véanse, por ejemplo, Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennet *et al.* (eds.), Plenum Press, Nueva York (1980); y Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988).

En un aspecto, la presente descripción proporciona fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo anti-polipéptidos que requieren IL-1Rrp2 de la invención. Tales fragmentos pueden consistir completamente en secuencias derivadas de anticuerpos o pueden comprender secuencias adicionales. Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno incluyen Fab, $F(ab')_2$, anticuerpos de cadena sencilla, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos de dominio. Se proporcionan otros ejemplos en Lunde *et al*, 2002, Biochem. Soc. Trans. 30:500-06.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona una proteína de unión a unión a antígeno que se une en o cerca del sitio de escisión por proteasa de IL-1F6, F8 o F9 o IL-1F5 humana. Pueden prepararse proteínas de unión a antígeno que se unen al sitio de escisión por proteasa usando cualquier técnica conocida en la técnica. Por ejemplo, tales proteínas de unión a antígeno pueden aislarse usando una proteína que requiere IL-1Rrp2 de longitud completa, o un fragmento más pequeño de la misma que comprende o que consiste en el sitio de escisión por proteasa (del que se proporcionan ejemplos en el presente documento). Pueden seleccionarse proteínas de unión a antígeno así aisladas para determinar su especificidad de unión usando cualquier método conocido en la técnica (del que se proporcionan ejemplos en el presente documento). Tales proteínas de unión a antígeno que funcionan como antagonistas de IL-1Rrp2 pueden emplearse en el tratamiento de cualquier estado inducido por IL-1Rrp2, incluyendo pero sin limitarse a estados inflamatorios.

La presente descripción proporciona además proteínas de unión a antígeno multiespecíficas, por ejemplo, proteína de unión a antígeno biespecífica, por ejemplo, proteína de unión a antígeno que se une a dos epítopos diferentes de una proteína que requiere IL-1Rrp2, o a un epítopo de un polipéptido que requiere IL-1Rrp2 y un epítopo de otra proteína que requiere IL-1Rrp2, a través de dos regiones o sitios de unión a antígeno diferentes. Se conocen en la técnica numerosos métodos de preparación de anticuerpos biespecíficos.

Aunque los anticuerpos humanos, parcialmente humanos o humanizados serán adecuados para muchas aplicaciones, particularmente las que implican la administración del anticuerpo a un sujeto no humano, otros tipos de proteínas de unión a antígeno serán adecuadas para determinadas aplicaciones. Los anticuerpos no humanos de la invención pueden ser, por ejemplo, derivados de cualquier animal productor de anticuerpos, tal como ratón, rata, conejo, cabra, mono o primate no humano (tal como mono (por ejemplo, cinomolgo o mono Rhesus) o simio (por ejemplo, chimpancé)). Los anticuerpos no humanos de la invención pueden usarse, por ejemplo, en aplicaciones *in vitro* y basadas en cultivo celular, o cualquier otra aplicación en la que no se produce, es insignificante, puede impedirse, no es una preocupación o se desea una respuesta inmunitaria frente al anticuerpo de la invención,

Pepticuerpos

Una clase adicional de compuestos útiles en la práctica de los métodos de la presente descripción son compuestos denominados a veces pepticuerpos. Tales compuestos son péptidos biológicamente activos que tiene un aumento de la semivida *in vivo* y un perfil de inmunogenicidad reducido. Esto se logra mediante la fusión del/de los péptido(s) con un vehículo, tal como se describe en la patente estadounidense 6.660.843 (cuya descripción se incorpora como referencia al presente documento). Brevemente, se preparan compuestos farmacológicamente activos seleccionando al menos un péptido que modula la actividad de una proteína de interés, por ejemplo, en este caso seleccionando un péptido que es un antagonista de la actividad de un polipéptido que requiere IL-1Rrp2 (por ejemplo, IL-1F6, F8, F9 o IL-1F5), como en un péptido que inhibe la escisión proteolítica de un agonista de IL-1Rrp2; y preparando una proteína de fusión del péptido seleccionado y multimerizando el vehículo.

Un vehículo de este tipo es un dominio Fc. Los péptidos seleccionados tal como se describió anteriormente se

expresan en una biblioteca de presentación en fago. El vehículo y el péptido pueden unirse a través del extremo N o C-terminal del péptido o el vehículo, tal como se describe adicionalmente en la patente estadounidense 6.660.843. También están abarcados por esta invención derivados de los compuestos anteriores.

Pueden prepararse moléculas antagonistas útiles en los procedimientos de esta descripción mediante métodos de síntesis convencionales, técnicas de ADN recombinante, o cualquier otro método de preparación de péptidos y proteínas de fusión. Pueden sintetizarse compuestos de esta invención que abarcan partes no peptídicas mediante reacciones de química orgánica convencionales, además de reacciones de química de péptidos convencionales cuando sea aplicable.

Los pepticuerpos pueden usarse para preparar derivados y otras formas de los mismos, sustancialmente tal como se describe para los anticuerpos.

Ácidos nucleicos

En un aspecto, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas. Los ácidos nucleicos comprenden, por ejemplo, polinucleótidos que codifican para la totalidad o una parte de un polipéptido que requiere IL-1Rrp2, por ejemplo, IL-1F5, F6, F8 o F9, una o ambas cadenas de un anticuerpo de la invención, o un fragmento, derivado, muteína, o variante del mismo, polinucleótidos suficientes para su uso como sondas de hibridación, cebadores de PCR o cebadores de secuenciación para la identificación, análisis, mutación o amplificación de un polinucleótido que codifica para un polipéptido, ácidos nucleicos antisentido para inhibir la expresión de un polinucleótido, y secuencias complementarias de los anteriores. Los ácidos nucleicos pueden ser de cualquier longitud. Pueden ser de, por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1.000, 1.500, 3.000, 5.000 o más nucleótidos de longitud, y/o pueden comprender una o más secuencias adicionales, por ejemplo, secuencias reguladoras, y/o ser parte de un ácido nucleico más grande, por ejemplo, un vector. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios y pueden comprender nucleótidos de ARN y/o ADN, y variantes artificiales de los mismos (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos).

Pueden introducirse cambios mediante mutación en un ácido nucleico, conduciendo de ese modo a cambios en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido que requiere IL-1Rrp2) para el que codifica. Pueden introducirse mutaciones usando cualquier técnica conocida en la técnica. En una realización, se cambian uno o más residuos de aminoácido particulares usando, por ejemplo, un protocolo de mutagénesis dirigida al sitio. En otra realización, se cambian uno o más residuos seleccionados aleatoriamente usando, por ejemplo, un protocolo de mutagénesis al azar. Sin embargo si se realiza, puede expresarse un polipéptido mutante y seleccionarse por una propiedad deseada (por ejemplo, unión a IL-1Rrp2 o bloqueo de la activación proteolítica de un miembro de la familia de IL-1 tal como IL-1F5, F6, F8 o F9).

En otro aspecto, la presente invención proporciona vectores que comprenden un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de la invención o una parte del mismo. Los ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, vectores virales, vectores de expresión y vectores de mamífero no episómicos, por ejemplo, vectores de expresión recombinantes.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden comprender un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula huésped. Los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas basándose en las células huésped que van a usarse para la expresión, que está unida operativamente a la secuencia de ácido nucleico que va a expresarse. Las secuencias reguladoras incluyen las que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células huésped (por ejemplo, potenciador del gen de expresión temprana de SV40, promotor del virus del sarcoma de Rous y promotor de citomegalovirus), los que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos sólo en determinadas células huésped (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido, véanse Voss *et al.*, 1986, Trends Biochem. Sci. 11:287, Maniatis *et al*, 1987, Science 236:1237, incorporados como referencia al presente documento en su totalidad), y los que dirigen la expresión inducible de una secuencia de nucleótidos en respuesta a un tratamiento o estado particular (por ejemplo, el promotor de metalotioneína en células de mamífero y el promotor sensible a tet y/o estreptomicina tanto en sistemas procariotas como eucariotas (véase íd.). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que va a transformarse, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Los vectores de expresión de la invención pueden introducirse en células huésped para producir de ese modo proteínas o péptidos, incluyendo proteínas de fusión o péptidos, codificados por ácidos nucleicos tal como se describe en el presente documento.

En otro aspecto, la presente invención proporciona células huésped en las que se ha introducido un vector de expresión recombinante de la invención. Una célula huésped puede ser cualquier célula procariota (por ejemplo, *E. coli*) o célula eucariota (por ejemplo, células de levadura, insecto o mamífero (por ejemplo, células CHO)). Puede introducirse ADN vector en células procariotas o eucariotas a través de técnicas de transformación o transfección convencionales. Para la transfección estable de células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y técnica de transfección usados, sólo una pequeña fracción de células puede integrar el ADN foráneo en su genoma. Para identificar y seleccionar estos integrantes, se introduce en general en las células huésped un gen

que codifica para un marcador seleccionable (por ejemplo, para la resistencia a antibióticos) junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen los que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Pueden identificarse las células transfectadas de manera estable con el ácido nucleico introducido mediante selección con fármacos (por ejemplo, las células que han incorporado el gen del marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán), entre otros métodos.

Expresión de proteínas o polipéptidos recombinantes

Puede usarse cualquier sistema de expresión conocido en la técnica para preparar los polipéptidos recombinantes de la invención (es decir, polipéptidos de IL-1Rrp2 recombinantes, proteínas de unión a antígeno recombinantes, pepticuerpos y similares). En general, de transforman células huésped con un vector de expresión recombinante que comprende ADN que codifica para un polipéptido deseado. Entre las células huésped que pueden emplearse se encuentran las células de procariotas, levaduras o eucariotas superiores. Los procariotas incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo *E. coli* o bacilos. Las células de eucariotas superiores incluyen células de insecto y líneas celulares establecidas de origen mamífero. Los ejemplos de líneas celulares de huésped mamífero adecuadas incluyen la línea COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (Gluzman *et al.*, 1981, Cell 23:175), células L, células 293, células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, líneas celulares BHK (ATCC CRL 10), y la línea celular CVI/EBNA derivada de la línea celular de riñón de mono verde africano CVI (ATCC CCL 70) tal como se describe por McMahan *et al*, 1991, EMBO J. 10:2821. Se describen vectores de clonación y expresión para su uso con huéspedes celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y de mamífero por Pouwels *et al.* (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, Nueva York, 1985).

Las células transformadas pueden cultivarse en condiciones que promueven la expresión del polipéptido, y el polipéptido recuperarse mediante procedimientos de purificación de proteínas convencionales. Un procedimiento de purificación de este tipo incluye el uso de cromatografía de afinidad, por ejemplo, en el caso de una proteína de unión a antígeno, sobre una matriz que tiene la totalidad o una parte del antígeno (por ejemplo, un polipéptido que requiere IL-1Rrp2 o parte del mismo) unido a la misma, o en el caso de una proteína que requiere IL-1Rrp2, sobre una matriz que tiene la totalidad o una parte de IL-1Rrp2, o una proteína de unión a antígeno que se une a la proteína que requiere IL-1Rrp2 unida a la misma. Los polipéptidos o las proteínas contemplados para su uso en el presente documento incluyen polipéptidos que requieren IL-1Rrp2 de mamífero recombinantes sustancialmente homogéneos, y/o anticuerpos contra los mismos, sustancialmente libres de materiales endógenos contaminantes.

Las proteínas pueden prepararse, y seleccionarse por sus propiedades deseadas, mediante cualquiera de varias técnicas conocidas. Determinadas técnicas implican aislar un ácido nucleico que codifica para una cadena de polipéptido (o parte del mismo) de un polipéptido que requiere IL-1Rrp2 de interés (por ejemplo, IL-1F6, F8 o F (o IL-1F5), y manipular el ácido nucleico a través de tecnología de ADN recombinante. Pueden manipularse de manera similar ácidos nucleicos que codifican para proteínas de unión a antígeno que se unen a un polipéptido que requiere IL-1Rrp2. El ácido nucleico puede fusionarse a otro ácido nucleico de interés, o alterarse (por ejemplo, mediante mutagénesis u otras técnicas convencionales) para añadir, delecionar o sustituir uno o más residuos de aminoácido, por ejemplo.

Ensayo y aislamiento de proteasa

Las proteínas que requieren IL-1Rrp2 descritas en el presente documento también serán útiles en la identificación y/o el aislamiento de una proteasa o proteasas que escinden las proteínas que requieren IL-1Rrp2 para producir la forma bioactiva de las mismas. Se describen métodos útiles, por ejemplo, en the Handbook Of Proteolytic Enzymes, segunda edición, editado por A. Barrett, N. Rawlings y J. Woessner (Academic Press, 2004). En general, los métodos para la identificación de la(s) proteasa(s) podrían incluir (a) someter a prueba proteasas conocidas para someter a prueba su capacidad para generar material biológicamente activo; (b) seleccionar sobrenadantes, membranas o lisados celulares por su capacidad para generar material biológicamente activo; y (c) usar la proteína que requiere IL-1Rrp2 de longitud completa (no escindida) como reactivo de afinidad para purificar la(s) proteasa(s).

Por ejemplo, pueden someterse a prueba proteasas conocidas para determinar la capacidad para escindir una proteína que requiere IL-1Rrp2 para dar una forma bioactiva poniendo en contacto una proteasa conocida con la proteína que requiere IL-1Rrp2 en condiciones que promueven la actividad proteasa, que determinar qué efecto, si lo hubiera, tuvo la proteasa sobre la actividad biológica de los polipéptidos que requieren IL-1Rrp2 (por ejemplo, actividad como agonista o antagonista tal como se describe en el presente documento). Pueden identificarse de manera similar células que expresan una proteasa (o proteasas) que escinde(n) proteínas que requieren IL-1Rrp2, o bien de manera intracelular, como polipéptido soluble o bien como proteína asociada a la superficie celular. Puede ser posible además usar una proteína que requiere IL-1Rrp2 para seleccionar una población celular enriquecida para la expresión de proteasa usando una técnica de clasificación celular o cribado, de las que se conocen muchas en la técnica. Cuando se ha identificado una fuente celular de la proteasa, la(s) proteína(s) que requiere(n) IL-1Rrp2 puede(n) usarse en un esfuerzo por aislar la proteasa.

Se conocen métodos de selección específicos en la técnica y junto con sistemas robóticos integrados y colecciones de compuestos químicos/productos naturales se incorporan extensamente en la selección de alto rendimiento de

modo que pueden someterse a prueba grandes números de compuestos de prueba para determinar su actividad en el plazo de un corto periodo de tiempo. Estos métodos incluyen formatos de ensayo homogéneos tales como transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, polarización de fluorescencia, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia con resolución temporal, ensayos de proximidad de centelleo, ensayos con genes indicadores, sustrato enzimático con extinción de fluorescencia, sustrato enzimático cromogénico y electroquimioluminiscencia.

Un ensayo de este tipo se basa en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET; por ejemplo, HTRF®, Packard Instrument Company, Meriden, CT; LANCE™, PerkinElmer LifeSciences, Wallac Oy., Turku, Finlandia) entre dos marcadores fluorescentes, un marcador de quelato de larga vida donador de energía y un aceptor orgánico de corta vida. La transferencia de energía se produce cuando los dos marcadores se ponen en estrecha proximidad a través de la interacción molecular entre un polipéptido de IL-1Rrp2 y una proteasa que lo escinde.

Indicaciones

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos de tratamiento de un sujeto. El método puede tener, por ejemplo, un efecto salubre en general sobre el sujeto, por ejemplo, puede aumentar la longevidad esperada del sujeto. Alternativamente, el método puede, por ejemplo, tratar, prevenir, aliviar o mejorar ("tratar") una enfermedad, un trastorno, un estado o una dolencia ("un estado"). Entre los estados que van a tratarse según la presente invención se encuentran estados caracterizados por la expresión o actividad inapropiada de IL-1Rrp2 y/o agonistas o antagonistas del mismo (por ejemplo, IL-1F6, F8 y/o F9 para lo primero, IL-1F5 para esto último). En algunos de tales estados, el nivel de expresión o actividad del receptor o agonista(s) del mismo es demasiado alto; en otros casos, el nivel de expresión o actividad de un(os) antagonista(s) del mismo es demasiado bajo. El tratamiento comprende administrar un antagonista de IL-1Rrp2 tal como se describe en el presente documento.

Los estados que se encuentran dentro de esta categoría presentan a menudo un fenotipo cutáneo inflamatorio con características comunes con las observadas en piel humana con psoriasis. Tales característica incluyen acantosis, hiperqueratosis, infiltrado dérmico, aumento de la expresión de queratina 6, aumento de la expresión de queratina 14, aumento de la expresión de ICAM-1 en dermis, queratinocitos basales y vasos sanguíneos, aumento de la expresión del marcador de macrófagos BM8 en dermis y disminución de la expresión en epidermis, y disminución de la expresión del marcador de células T CD3 en epidermis.

Estados médicos y enfermedades específicos que pueden tratarse o prevenirse con los antagonistas de IL-1Rrp2 de esta invención incluyen los asociados con enfermedades inflamatorias de la piel incluyendo, pero sin limitarse a psoriasis, dermatitis seborreica, dermatitis atópica (incluyendo dermatitis atópica crónica o DAC), dermatitis de contacto alérgica, liquen simple crónico, pitiriasis rubra pilaris y dermatitis numular.

Además, el epitelio normal de las vías respiratorias tiene una expresión relativamente alta de miembros de la familia de IL-1 F5, F6, F8 y F9, así como del receptor IL-1Rrp2, y la instilación intranasal de F8 o F9 conduce a un flujo de entrada de neutrófilos en el pulmón. Por consiguiente, los antagonistas de IL-1Rrp2 pueden estar indicados para estados inflamatorios de las vías respiratorias, por ejemplo asma y rinitis alérgica. IL-1F9 e IL-1Rrp2 se expresan altamente en el esófago, y la interacción entre este par de citocina/receptor puede desempeñar un papel en la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), que puede mejorarse por consiguiente mediante antagonistas de IL-1Rrp2.

IL-1F8 e IL-1Rrp2 se expresan también en condrocitos y fibroblastos sinoviales, y se inducen en mayores niveles en esas células por IL-1 y TNF. Además, estas células responden a IL-1F8 exógeno sintetizando IL-6, IL-8 y óxido nítrico. Por consiguiente, los antagonistas de IL-1Rrp2 de la invención pueden tener uso en estados artríticos mediados por los polipéptidos inducidos (es decir, artritis reumatoide, artritis psoriásica, otros estados artríticos en los que TNF y/o IL-1 desempeñan un papel, y osteoartritis y estados relacionados en los que óxido nítrico desempeña un papel)

Los métodos descritos en el presente documento pueden tratarse con los antagonistas de IL-1Rrp2 de esta invención en combinación con otras citocinas, inhibidores de citocinas y reactivos (también denominados en el presente documento inmunomoduladores). Por ejemplo, los antagonistas de IL-18; incluyendo el receptor de IL-18 soluble, los anticuerpos contra IL-18 o el receptor de IL-18, proteína de unión a IL-18; inhibidores de TNF, incluyendo ENBREL®; inhibidores de IL-1, incluyendo formas solubles de IL-1R tipo II, IL-1R tipo II, anticuerpos contra IL-1, anticuerpos contra IL-1R tipo I; y/u otros agentes activos que son eficaces en el tratamiento de los estados médicos y las enfermedades dados a conocer.

Las composiciones y/o los métodos de la presente invención también pueden usarse, por ejemplo, en tratamientos cosméticos, en tratamientos veterinarios, para aumentar la longevidad, para evitar defectos en la reproducción y para tratar una variedad de trastornos relacionados con IL-1Rrp2. Además, en determinados de tales estados, el nivel de expresión o actividad de agonistas de IL-1Rrp2 es demasiado bajo, y el tratamiento comprende administrar un agonista de IL-1Rrp2 tal como IL-1F6, F8 y/o F9; tales tratamientos también están abarcados en el presente documento.

Métodos terapéuticos y administración de antagonistas de IL-1Rrp2

Determinados métodos proporcionados en el presente documento comprenden administrar un antagonista de IL-1Rrp2 a un sujeto, reduciendo de ese modo la respuesta biológica inducida por un miembro de la familia de IL-1 que desempeña un papel en un estado particular. En realizaciones particulares, los métodos de la invención implican poner en contacto células que expresan IL-1Rrp2 endógenas con un antagonista de IL-1Rrp2, por ejemplo, a través de la administración a un sujeto o en un procedimiento *ex vivo*.

El término "tratamiento" abarca el alivio o la prevención de al menos un síntoma u otro aspecto de un trastorno, o la reducción de la gravedad de la enfermedad, y similares. No es necesario que un antagonista de IL-1Rrp2 efectúe una cura completa, ni que erradique cada síntoma o manifestación de una enfermedad, para constituir un agente terapéutico viable. Tal como se reconoce en el campo pertinente, los fármacos empleados como agentes terapéuticos pueden reducir la gravedad de un estado patológico dado, pero no es necesario que supriman cada manifestación de la enfermedad para considerarse agentes terapéuticos útiles. De manera similar, no es necesario que un tratamiento administrado de manera profiláctica sea completamente eficaz en la prevención de la aparición de un estado para un agente terapéutico viable. Simplemente es suficiente con que reduzca el impacto de una enfermedad (por ejemplo, reduciendo el número o la intensidad de sus síntomas, o aumentando la eficacia de otro tratamiento, o produciendo otro efecto beneficioso), o que reduzca la probabilidad de que la enfermedad se produzca o empeore en un sujeto. Una realización de la invención se refiere a un método que comprende administrar a un paciente un antagonista de IL-1Rrp2 en una cantidad y durante un tiempo suficientes para inducir una mejora sostenida con respecto al nivel inicial de un indicador que refleja la gravedad del trastorno particular.

Tal como se entiende en el campo pertinente, se administran composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de la invención a un sujeto de manera apropiada para la indicación. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante cualquier técnica adecuada, incluyendo pero sin limitarse a por vía parenteral, de manera tópica o mediante inhalación. Si se inyecta, la composición farmacéutica puede administrarse, por ejemplo, por las vías intraarticular, intravenosa, intramuscular, intralesional, intraperitoneal o subcutánea, mediante inyección en bolo o infusión continua. Se contempla la administración localizada, por ejemplo en un sitio de enfermedad o lesión, como lo son la administración transdérmica y la liberación sostenida a partir de implantes. La administración mediante inhalación incluye, por ejemplo, la inhalación nasal u oral, el uso de un nebulizador, la inhalación del antagonista en forma de aerosol, y similares. Otras alternativas incluyen colirios; preparaciones orales incluyendo pastillas, jarabes, pastillas para chupar o chicle; y preparaciones tópicas tales como lociones, geles, pulverizaciones y pomadas.

También se contempla el uso de antagonistas de IL-1Rrp2 para ello en procedimientos *ex vivo*. Por ejemplo, puede ponerse en contacto la sangre u otro líquido corporal de un paciente con un polipéptido que requiere IL-1Rrp2 que se une a una enzima tal como una proteasa *ex vivo*. Los polipéptidos que requieren IL-1Rrp2 pueden unirse a una matriz insoluble o material de soporte sólido adecuado.

Ventajosamente, se administran los antagonistas de IL-1Rrp2 en forma de una composición que comprende uno o más componentes adicionales tales como un portador, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable. Opcionalmente, la composición comprende adicionalmente uno o más agentes fisiológicamente activos, por ejemplo, una segunda sustancia que inhibe la inflamación o el sistema inmunitario, una sustancia anti-angiogénica, una sustancia analgésica, etc., de las que se proporcionan ejemplos no exclusivos en el presente documento. En diversas realizaciones particulares, la composición comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis agentes fisiológicamente activos además de un antagonista de IL-1Rrp2.

En una realización, la composición farmacéutica comprende un antagonista de IL-1Rrp2 de la invención junto con una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en un tampón, un antioxidante tal como ácido ascórbico, un polipéptido de bajo peso molecular (tal como los que tienen menos de 10 aminoácidos), una proteína, un aminoácido, un hidrato de carbono tal como glucosa, sacarosa o dextrinas, un agente quelante tal como EDTA, glutatión, un estabilizador y un excipiente. Solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina sérica conespecífica son ejemplos de diluyentes apropiados. Según las normas industriales apropiadas, también pueden añadirse conservantes tales como alcohol bencílico. La composición puede formularse como un liofilizado usando disoluciones de excipientes adecuadas (por ejemplo, sacarosa) como diluyentes. Los componentes adecuados no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Se presentan ejemplos adicionales de componentes que pueden emplearse en formulaciones farmacéuticas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª ed. (1980) y 20ª ed. (2000), Mack Publishing Company, Easton, PA.

Los kits para su uso por profesionales médicos incluyen una sustancia que inhibe IL-1Rrp2 de la invención y un marcador u otras instrucciones para su uso en el tratamiento de cualquiera de los estados comentados en el presente documento. En una realización, el kit incluye una preparación estéril de uno o más antagonistas de IL-1Rrp2 para ello, que puede estar en forma de una composición tal como se dio a conocer anteriormente, y puede estar en uno o más viales.

Las dosificaciones y la frecuencia de administración pueden variar según factores tales como la vía de administración, los antagonistas de IL-1Rrp2 particulares empleados, la naturaleza y gravedad de la enfermedad que

va a tratarse, si el estado es agudo o crónico, y el tamaño y el estado general del sujeto. Pueden determinarse dosificaciones apropiadas mediante procedimientos conocidos en la técnica pertinente, por ejemplo en ensayos clínicos que pueden implicar estudios de ajuste a escala de la dosis.

Puede administrarse una sustancia que inhibe IL-1Rrp2 de la invención, por ejemplo, una vez o más de una vez, por ejemplo, a intervalos regulares a lo largo de un periodo de tiempo. En realizaciones particulares, se administra un antagonista de IL-1Rrp2 a lo largo de un periodo de al menos un mes o más, por ejemplo, durante uno, dos o tres meses o incluso indefinidamente. Para el tratamiento de estados crónicos, en general lo más eficaz es el tratamiento a largo plazo. Sin embargo, para el tratamiento de estados agudos, puede ser suficiente la administración durante periodos más cortos, por ejemplo de desde una hasta seis semanas. En general, se administra el antagonista de IL-1Rrp2 hasta que el paciente manifiesta un grado de mejora médicamente relevante con respecto al nivel inicial para el indicador o indicadores elegidos.

Realizaciones particulares de la presente invención implican administrar un antagonista de IL-1Rrp2 a una dosificación de desde aproximadamente 1 ng de proteína por kg de peso del sujeto al día ("1 ng/kg/día") hasta aproximadamente 10 mg/kg/día, más preferiblemente desde aproximadamente 500 ng/kg/día hasta aproximadamente 5 mg/kg/día, y lo más preferiblemente desde aproximadamente 5 microgramos/kg/día hasta aproximadamente 2 mg/kg/día, a un sujeto. En realizaciones adicionales, se administra un antagonista de IL-1Rrp2 a adultos una vez a la semana, dos veces a la semana, o tres o más veces a la semana, para tratar una enfermedad, estado o trastorno mediado por IL-1Rrp2, por ejemplo, un trastorno médico dado a conocer en el presente documento. Si se inyecta, la cantidad eficaz de antagonista de IL-1Rrp2 por dosis de adulto puede oscilar entre 1-20 mg/m^2, y preferiblemente es de aproximadamente 5-12 mg/m^2. Alternativamente, puede administrarse una dosis plana; la cantidad puede oscilar entre 5-100 mg/dosis. Un intervalo para una dosis plana es de aproximadamente 20-30 mg por dosis. En una realización de la invención, se administra repetidamente una dosis plana de 25 mg/dosis mediante inyección. Si se usa una vía de administración distinta a la inyección, la dosis se ajusta apropiadamente según las prácticas médicas convencionales. Un ejemplo de un régimen terapéutico implica inyectar una dosis de aproximadamente 20-30 mg de antagonista de IL-1Rrp2 de una a tres veces a la semana a lo largo de un periodo de al menos tres semanas, aunque puede ser necesario el tratamiento durante periodos más largos para inducir el grado de mejora deseado. Para sujetos pediátricos (de 4-17 años de edad), un régimen adecuado a modo de ejemplo implica la inyección subcutánea de 0,4 mg/kg, hasta una dosis máxima de 25 mg de antagonista de IL-1Rrp2 administrados dos o tres veces a la semana.

Realizaciones particulares de los métodos proporcionados en el presente documento implican la inyección subcutánea de desde 0,5 mg hasta 10 mg, preferiblemente desde 3 hasta 5 mg, de un antagonista de IL-1Rrp2, una o dos veces a la semana. Otra realización se refiere a la administración pulmonar (por ejemplo, mediante nebulizador) de 3 o más mg de antagonista de IL-1Rrp2 una vez a la semana.

Los ejemplos de regímenes terapéuticos proporcionados en el presente documento comprenden la inyección subcutánea de un antagonista de IL-1Rrp2 una vez a la semana, a una dosis de 1,5 a 3 mg, para tratar un estado en el que la señalización de IL-1Rrp2 desempeña un papel. Se proporcionan ejemplos de tales estados en el presente documento e incluyen, por ejemplo, estados inflamatorios de la piel, incluyendo pero sin limitarse a psoriasis, dermatitis seborreica, dermatitis atópica (incluyendo dermatitis atópica crónica o CAD), dermatitis de contacto alérgica, liquen simple crónico, pitiriasis rubra pilaris y dermatitis numular. La administración semanal de antagonista de IL-1Rrp2 se continúa hasta que se logra un resultado deseado, por ejemplo, disminuyen los síntomas del sujeto. El tratamiento puede reanudarse según sea necesario, o, alternativamente, puede administrarse una dosis de mantenimiento.

Otros ejemplos de regímenes terapéuticos proporcionados en el presente documento comprenden la administración subcutánea o intravenosa de una dosis de 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15 ó 20 miligramos de un inhibidor de IL-1Rrp2 de la presente invención por kilogramo de masa corporal del sujeto (mg/kg). La dosis puede administrarse una vez al sujeto, o más de una vez a un determinado intervalo, por ejemplo, una vez al día, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez al semana, tres veces al mes, dos veces al mes, una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada seis meses, o una vez al año. La duración del tratamiento, y cualquier cambio en la dosis y/o frecuencia de tratamiento, pueden alterarse o variarse durante el transcurso del tratamiento para satisfacer las necesidades particulares del sujeto.

En otra realización, se administra un antagonista de IL-1Rrp2 al sujeto en una cantidad y durante un tiempo suficientes para inducir una mejora, preferiblemente una mejora sostenida, en al menos un indicador que refleja la gravedad del trastorno que esté tratándose. Pueden evaluarse distintos indicadores que reflejan la extensión de la dolencia, la enfermedad o el estado del sujeto para determinar si la cantidad y el tiempo del tratamiento son suficientes. Tales indicadores incluyen, por ejemplo, indicadores reconocidos clínicamente de gravedad de la enfermedad, síntomas o manifestaciones del trastorno en cuestión. En una realización, se considera que una mejora es sostenida si el sujeto presenta la mejora en al menos dos ocasiones separadas por de dos a cuatro semanas. El grado de mejora se determina en general por un médico, que realiza esta determinación basándose en signos, síntomas, biopsias u otros resultados de pruebas, y que también puede emplear cuestionarios que se suministran al sujeto, tal como cuestionarios de calidad de vida desarrollados para una enfermedad dada.

Se asocian elevación de los niveles de IL-1Rrp2, IL-1F6, IL-1F8 y/o IL-1F9 y/o la activación de los mismos, y/o disminución de los niveles y/o activación de IL-1F5, con varios trastomos, incluyendo, por ejemplo, estados inflamatorios de la piel, incluyendo pero sin limitarse a psoriasis, dermatitis seborreica, dermatitis atópica (incluyendo dermatitis atópica crónica o CAD), dermatitis de contacto alérgica, liquen simple crónico, pitiriasis rubra pilaris y dermatitis numular. Otros estados de este tipo incluyen estados inflamatorios de las vías respiratorias, del esófago y las articulaciones.

Pueden seleccionarse sujetos con un trastorno dado, para identificar aquellos individuos que tienen elevación de la actividad de IL-1Rrp2, IL-1F6, IL-1F8 y/o IL-1F9 (o disminución de la activación de IL-1F5), identificando de ese modo los sujetos que pueden beneficiarse más del tratamiento con un antagonista de IL-1Rrp2. Por tanto, los métodos de tratamiento proporcionados en el presente documento comprenden opcionalmente una primera etapa de medida de los niveles de activación de IL-1Rrp2, IL-1F6, IL-1F8 y/o IL-1F9 (o IL-1F5) de un sujeto. Puede administrarse un antagonista de IL-1Rrp2 a un sujeto en el que la activación de IL-1Rrp2, IL-1F6, IL-1F8 y/o IL-1F9 está elevada por encima de lo normal, y/o cuya actividad de IL-1F5 está por debajo de lo normal.

Pueden monitorizarse los niveles de actividad de IL-1Rrp2, IL-1F6, IL-1F8, IL-1F9 y/o IL-1F5 de un sujeto antes, durante y/o después del tratamiento con un antagonista de IL-1Rrp2, para detectar cambios, si los hubiera, en la actividad de IL-1Rrp2, IL-1F6, IL-1F8, IL-1F9 y/o IL-1F5. Para algunos trastornos, la incidencia de elevación de la actividad de IL-1Rrp2, IL-1F6, IL-1F8 y/o IL-1F9, o la disminución de la actividad de IL-1F5, puede variar según factores tales como el estadio de la enfermedad o la forma particular de la enfermedad. Pueden emplearse técnicas conocidas para medir la actividad de IL-1Rrp2, IL-1F6, IL-1F8, IL-1F9 y/o IL-1F5, por ejemplo, en muestras de suero, sangre o tejido de un sujeto. Puede medirse la actividad de IL-1Rrp2, IL-1F6, IL-1F8, IL-1F9 y/o IL-1F5 usando cualquier técnica adecuada.

Realizaciones particulares de métodos y composiciones de la invención implican el uso de un antagonista de IL-1Rrp2 y uno o más antagonistas de IL-1Rrp2 adicionales, por ejemplo, dos o más proteínas que requieren IL-1Rrp2 de la invención, dos o más proteínas de unión a antígeno de la invención, o combinaciones de proteínas que requieren IL-1Rrp2 y proteínas de unión a antígeno. En realizaciones adicionales, se administran antagonistas de IL-1Rrp2 solos o en combinación con otros agentes útiles para tratamiento del estado del que está aquejado el paciente. Los ejemplos de tales agentes incluyen fármacos tanto proteicos como no proteicos. Cuando se coadministran múltiples agentes terapéuticos, pueden ajustarse las dosificaciones en consecuencia, tal como se reconoce en la técnica pertinente. "Coadministración" y terapia de combinación no se limitan a la administración simultánea, sino que también incluyen regímenes de tratamiento en los que se administra un antagonista de IL-1Rrp2 al menos una vez durante un ciclo de tratamiento que implica administrar al menos otro agente terapéutico al paciente.

Ejemplos de otros agentes que pueden coadministrarse con un antagonista de IL-1Rrp2 son otras proteínas que requieren IL-1Rrp2 o proteínas de unión a antígeno, o polipéptidos terapéuticos que se eligen según el estado particular que va a tratarse. Alternativamente, pueden coadministrarse fármacos no proteicos que son útiles en el tratamiento de uno de los estados particulares comentados anteriormente, con antagonista de IL-1Rrp2.

Terapia de combinación

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de tratamiento de un sujeto con un antagonista de IL-1Rrp2, y uno o más de otros tratamientos. En una realización, una terapia de combinación de este tipo logra sinergia o un efecto aditivo, por ejemplo, atacando múltiples sitios o dianas moleculares en un tumor. Los tipos de terapias de combinación que pueden usarse en relación con la presente invención incluyen inhibir o activar (según sea apropiado) múltiples nodos en una única ruta relacionada con enfermedad, múltiples rutas en una célula diana y múltiples tipos celulares dentro de un tejido diana.

En otra realización, un método de terapia de combinación comprende administrar al sujeto dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más de los agonistas o antagonistas descritos en el presente documento. En otra realización, el método comprende administrar al sujeto dos o más tratamientos que inhiben o activan juntos (directa o indirectamente) la transducción de señales mediada por IL-1Rrp2. Los ejemplos de tales métodos incluyen usar combinaciones de dos o más proteínas que requieren IL-1Rrp2 y/o proteínas de unión a antígeno, un polipéptido que requiere IL-1Rrp2 o proteína de unión a antígeno y uno o más de otros restos terapéuticos que tienen propiedades antiinflamatorias (por ejemplo, agentes antiinflamatorios no esteroideos, esteroides y/o inmunomoduladores), o un polipéptido que requiere IL-1Rrp2 o proteína de unión a antígeno y uno o más de otros tratamientos (por ejemplo, cirugía, ultrasonidos o tratamiento eficaz para reducir la inflamación). Además, pueden usarse uno o más antagonistas de IL-1Rrp2 en combinación con una o más moléculas u otros tratamientos, en los que las otras molécula(s) y/o tratamiento(s) no se unen directamente a ni afectan a IL-1Rrp2, pero siendo la combinación eficaz para el tratamiento o la prevención del estado que esté tratándose. En una realización, una o más de la molécula(s) y/o tratamiento(s) trata o previene un estado que está provocado por una o más de las otras molécula(s) o tratamiento(s) en el ciclo de terapia, por ejemplo, náuseas, fatiga, alopecia, caquexia, insomnio, etc. En cada caso en el que se usa una combinación de moléculas y/u otros tratamientos, la(s) molécula(s) y/o tratamiento(s) individual(es) puede(n) administrarse en cualquier orden, a lo largo de cualquier periodo de tiempo, que sea eficaz, por ejemplo, de manera simultánea, consecutiva o alterna. En una realización, el método de tratamiento comprende

completar un primer ciclo de tratamiento con una molécula u otro tratamiento antes de comenzar un segundo ciclo de tratamiento. El periodo de tiempo entre el final del primer ciclo de tratamiento y el comienzo del segundo ciclo de tratamiento puede ser cualquier periodo de tiempo que permita que el ciclo total de terapia sea eficaz, por ejemplo, segundos, minutos, horas, días, semanas, meses, o incluso años.

En otra realización, el método comprende administrar uno o más de los antagonistas de IL-1Rrp2 descritos en el presente documento y uno o más de otros tratamientos (por ejemplo, un tratamiento terapéutico o paliativo). Cuando un método comprende administrar más de un tratamiento a un sujeto, ha de entenderse que el orden, el momento, el número, la concentración y el volumen de las administraciones sólo está limitado por los requisitos médicos y las limitaciones del tratamiento, es decir, pueden administrarse dos tratamientos al sujeto, por ejemplo, de manera simultánea, consecutiva, alterna, o según cualquier otro régimen.

La memoria descriptiva se entiende de la manera más exhaustiva a la luz de las enseñanzas de la bibliografía citada dentro de la memoria descriptiva, que se incorpora al presente documento como referencia. Los siguientes ejemplos, tanto reales como proféticos, se proporcionan con el fin de ilustrar las realizaciones o características específicas de la presente invención y no de limitar su alcance.

EJEMPLO 1

Ejemplo 1A: Preparación de variantes de IL-1F6

Este ejemplo describe la preparación de diversas variantes N-terminales de IL-1F6. Se muestran las diversas variantes de deleción N-terminal en la tabla 1 a continuación:

Tabla 1: Secuencia de aminoácidos de variantes de IL-1F6

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos N-terminal de variantes de IL-1F6 (... indica aminoácidos intermedios de Il-1F6 humana (SEQ ID NO 2; FLAG indica la secuencia de aminoácidos DYKDDDDK; polyHis indica una cadena de múltiples histidinas; normalmente de aproximadamente 6)	Polipéptidos de variantes de IL-1F6 (Hu indica humano; WT indica polipéptido de tipo natural de longitud completa; FpH indica una cola de FLAG-poli-His, la letra y el número en negrita, cursiva y mayúscula se refiere al aminoácido y su posición indicados en SEQ ID NO 2 en la que la posición es en relación con el aminoácido N-terminal en la posición uno de SEQ ID NO 2.)
22	MEKALKIDTPQQGSIQDI...FGLTMLF-FLAG-polyHis	HuIL-1F6***WT***/FpH
23	MKIDTPQQGSIQDI...FGLTMLF-FLAG-polyHis	HuIL-1F6***K6***/FpH
24	MIDTPQQGSIQDI...FGLTMLF-FLAG-polyHis	HuIL-1F6***I7***/FpH
25	MDTPQQGSIQDI...FGLTMLF-FLAG-polyHis	HuIL-1F6***D8***/FpH
26	KIDTPQQGSIQDI...FGLTMLF	HuIL-1F6***K6***

Nota: El polipéptido de IL1-F6 aparece en 2 isotipos. Un isotipo comprende una Q en el aminoácido 12, con relación a la M en la posición uno de la IL1-F6 de tipo natural indicada en la tabla 1 como SEQ ID NO 22 y otro que codifica para R en la posición 12. Se proporcionan variantes de ambos mediante las composiciones y los métodos de la invención.

Se prepararon variantes N-terminales que comprenden una cola de FLAG-poliHis C-terminal tal como se describe inmediatamente a continuación. Se amplificaron variantes N-terminales a través de PCR usando como molde un clon de ADNc que codifica para huIL-1F6 (AF201831). Se colocó una metionina N-terminal directamente antes del aminoácido de inicio deseado de cada variante para la iniciación de la traducción apropiada. Se añadieron colas de FLAG® (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) y poliHis al extremo C-terminal para purificación/detección. Se añadieron sitios NdeI y XhoI a los extremos 5' y 3', respectivamente. Se digirieron los amplicones resultantes con NdeI y XhoI y se subclonaron en el vector de expresión de *E. coli*, pAMG21 (n.º ATCC 98113). Se introdujeron los constructos resultantes en *E. coli* DH10B y se indujo la expresión mediante la adición de [N-(3-oxo-hexanoil)homoserina-lactona]. Entonces se purificaron los polipéptidos expresados a partir de lisados bacterianos (fracción soluble) mediante cromatografía de afinidad usando columnas de Ni-NTA (Qiagen, Germantown, Maryland n.º de cat. 30600) según el protocolo del fabricante, y se sometieron a prueba para determinar la actividad en un ensayo con indicador sustancialmente tal como se describe en el ejemplo 2. Se muestran los resultados en la tabla 5 a continuación.

Se preparó la variante N-terminal, HuIL-1F6***K6***, mediante PCR amplificando un clon de ADNc molde que codifica para la variante huIL-1F6***K6***. Los cebadores usados en PCR permitieron que los productos de PCR se situasen usando el sistema de clonación por PCR In-Fusion™ (Clontech, Mountain Vista, CA, n.º de cat. 631774), según el protocolo del fabricante, en un vector pET-SUMO (Invitrogen, Carlsbad, CA, cat. K300-01). Este procedimiento pone una cola de pH-SUMO en 5' con respecto al aminoácido de inicio deseado de la variante de IL-1F6 en el vector, lo que da como resultado la siguiente secuencia de ácido nucleico en la que la cola de pH SUMO discurre desde el

extremo 5' hasta el nucleótido subrayado en negrita que indica el inicio de la secuencia de ácido nucleico que codifica para HuIL-IF6K6:

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACGGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCGCTAGCATGTCGGACT
CAGAAGTCAATCAAGAAGCTAAGCCAGAGGTCAAGCCAGAAGTCAAGCCTGAGACTCACATCAATTTAAAGGTG
TCCGATGGATCTTCAGAGATCTTCTTCAAGATCAAAAAGACCACTCCTTTAAGAAGGCTGATGGAAGCGTTCGCT
AAAAGACAGGGTAAGGAAATGGACTCCTTAAGATTCTTGTACGACGGTATTAGAATTCAAGCTGATCAGACCCCT
GAAGATTTGGACATGGAGGATAACGATATTATTGAGGCTCACAGAGAACAGATTGGTGGTAAAATTGACACACCT
CAGCGGGGGAGCATTCAGGATATCAATCATCGGGTGTGGGTTCTTCAGGACCAGACGCTCATAGCAGTCCCGA
GGAAGGACCGTATGTCTCCAGTCACTATTGCCTTAATCTCATGCCGACATGTGGAGACCCTTGAGAAAGACAGA
GGGAACCCCATCTACCTGGGCCTGAATGGACTCAATCTCTGCCTGATGTGTGCTAAAGTCGGGGACCAGCCCA
CACTGCAGCTGAAGGAAAAGGATATAATGGATTTGTACAACCAACCCGAGCCTGTGAAGTCCTTTCTCTTCTACC
ACAGCCAGAGTGGCAGGAACTCCACCTTCGAGTCTGTGGCTTTCCCTGGCTGGTTCATCGCTGTCAGCTCTGAA
GGAGGCTGTCCTCTCATCCTTACCCAAGAACTGGGGAAAGCCAACACTACTGACTTTGGGTTAACTATGCTGTTT
TAA (SEQ ID NO 78).

Se introdujo el constructo resultante en *E. coli* DH10B. Se llevó a cabo la expresión usando el sistema de autoinducción Overnight Express™ (Novagen, Darmstadt, Alemania, n.º de cat. 71300-3) según el protocolo del fabricante. Se centrifugaron las células de *E. coli* y se congelaron.

Se descongelaron los sedimentos celulares de *E. coli* congelados en TBS preparado en cóctel de inhibidores de proteasa libre de EDTA completo de Roche. Tras la descongelación, se añadió benzonasa. Se lisaron las células mediante su paso a través de un dispositivo 110L microfluidizador de Microfluidics (MFIC Corporation, Newton, MA) y se clarificaron los lisados resultantes mediante centrifugación. Se sometieron a filtración esterilizante los sobrenadantes y se cargaron sobre 5 ml de columnas de Ni-Sepharose HisTrap (GE Biosciences, Piscataway, NJ) equilibradas en Tris, NaCl, imidazol pH 7,4. Se lavaron las columnas con imidazol en TBS. Se eluyó la proteína con un gradiente lineal de imidazol. Se combinaron las fracciones eluidas y se dializaron en PBS usando casetes de diálisis Slide-A-Lyzers de MWCO (Pierce Biotechnology, Inc., Rockland, IL). Se usó SUMO-proteasa-1 de LifeSensors para escindir la pareja de fusión de His-SUMO de la variante de IL-1F6. Se dializaron los productos de la reacción de escisión en TBS que contenía EDTA, pH 7,4 usando casetes de diálisis Slide-A-Lyzers de MWCO. Entonces se hicieron pasar las combinaciones dializadas de vuelta por las columnas de Ni-Sepharose HisTrap y se conservaron las fracciones no retenidas que contenían la variante de IL-1F6 liberada pura, y se sometieron a prueba para determinar la actividad tal como se describe en el ejemplo 2B a continuación. Se muestran los resultados en la tabla 7 a continuación.

Ejemplo 1B: Preparación de variantes de IL-1F8

Se prepararon variantes de IL-1F8 que comprendían una cola de FLAG-poliHis de manera sustancialmente similar que para las variantes de cola de FLAH-poliHis de IL-F6 descritas en el ejemplo 1A anterior, usando como molde un clon de ADNc que codifica para huIL-1F8 (AF201833). Asimismo, se preparó HuIL-1F8R5 (que carece de una cola de FLAG-poliHis), usando como molde un clon de ADNc que codifica para huIL-1F8 (AF201833), y se purificó de manera sustancialmente similar a HuIL-1F6***K6*** descrito en el ejemplo 1A anterior. Se muestran las diversas variantes de deleción N-terminal en la tabla 2 a continuación:

Tabla 2: Secuencia de aminoácidos de variantes de IL-1F8

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos N-terminal de variantes de IL-1F8 (... indica aminoácidos intermedios de Il-1F8 humana (SEQ ID NO 3); () indica que se elimina el aminoácido encerrado; FLAG indica la secuencia de aminoácidos DYKDDDDK; polyHis indica una cadena de múltiples histidinas; normalmente de 6)	Polipéptidos de variantes de IL-1F6 (Hu indica humano; WT indica polipéptido de tipo natural de longitud completa; FpH indica una cola de FLAG-poli-His, la letra y el número en negrita, cursiva y mayúscula se refiere al aminoácido y su posición en SEQ ID NO 3 en la que la posición es en relación con el aminoácido N-terminal en la posición uno de SEQ ID NO 3.)
27	MNPQREAAPKSYAIR...FYLDSVE-FLAG-polyHis	HuIL-1F8WT/FpH
28	MQREAAPKSYAIR...FYLDSVE-FLAG-polyHis	HuIL-1F8***Q4***/FpH
29	MREAAPKSYAIR...FYLDSVE-FLAG-polyHis	HuIL-1F8***R5***/FpH
30	MEAAPKSYAIR...FYLDSVE-FLAG-polyHis	HuIL-1F8***E6***/FpH
31	(M)AAPKSYAIR...FYLDSVE-FLAG-polyHis	HuIL-1F8***A7***/FpH
32	REAAPKSYAIR...FYLDSVE	HuIL-1F8***R5***

Se expresaron los constructos de FLAG-poliHis en *E. coli*, y se purificaron los polipéptidos expresados a partir de lisados bacterianos (fracción soluble) mediante cromatografía de afinidad usando columnas de Ni-NTA (Qiagen n.º de cat. 30600) según el protocolo del fabricante. La secuenciación N-terminal indicó que, para un constructo (HuIL-1F8A7/FpH), se eliminó la Met N-terminal (designada entre paréntesis en la tabla 2). Se sometieron a prueba los

polipéptidos purificados para determinar la actividad en un ensayo con indicador sustancialmente tal como se describe en el ejemplo 2; se muestran los resultados en la tabla 5 a continuación.

Se introdujo el constructo de pH-SUMO, que codifica para HuIL-1F8R5 en *E. coli* DH10B. Se llevó a cabo la expresión usando el sistema de autoinducción Overnight Express™ (Novagen, Darmstadt, Alemania, n.º de cat. 71300-3) según el protocolo del fabricante. Se centrifugaron las células de *E. coli* y se congelaron. Se descongelaron los sedimentos celulares de *E. coli* congelados en TBS preparado en cóctel de inhibidores de proteasa libre de EDTA completo de Roche. Tras la descongelación, se añadió benzonasa. Se lisaron las células mediante su paso a través de un dispositivo 110L microfluidizador de Microfluidics (MFIC Corporation, Newton, MA) y se clarificaron los lisados resultantes mediante centrifugación. Se sometieron a filtración esterilizante los sobrenadantes y se cargaron sobre 5 ml de columnas de Ni-Sepharose HisTrap (GE Biosciences, Piscataway, NJ) equilibradas en Tris, NaCl, imidazol pH 7,4. Se lavaron las columnas con imidazol en TBS. Se eluyó la proteína con un gradiente lineal de imidazol. Se combinaron las fracciones eluidas y se dializaron en PBS usando casetes de diálisis Slide-A-Lyzers de MWCO (Pierce Biotechnology, Inc., Rockland, IL). Se usó SUMO-proteasa-1 de LifeSensors para escindir la pareja de fusión de His-SUMO de la variante de IL-1F6. Se dializaron los productos de la reacción de escisión en TBS que contenía EDTA, pH 7,4 usando casetes de diálisis Slide-A-Lyzers de MWCO. Entonces se hicieron pasar las combinaciones dializadas de vuelta por las columnas de Ni-Sepharose HisTrap y se conservaron las fracciones no retenidas que contenían la variante de IL-1F6 liberada pura, y se sometieron a prueba para determinar la actividad tal como se describe en el ejemplo 2B a continuación. Se muestran los resultados en la tabla 7 a continuación.

Ejemplo 1C: Preparación de variantes de IL-1F9

Se prepararon variantes de IL-1F9 que comprendían una cola de FLAG-poliHis C-terminal de manera sustancialmente similar a como se describe en el ejemplo 1A anterior, usando como molde un clon de ADNc que codifica para huIL-IF9 (AF200492). HuIL-1F9S18 (que carece de una cola de FLAG-poliHis C-terminal), usando como molde un clon de ADNc que codifica para huIL-IF9 (AF200492), y se purificaron de manera sustancialmente similar a HuIL-1F6***K6*** descrito en el ejemplo 1A anterior excepto porque se eliminó un par de bases de timina extra usando un kit de mutagénesis dirigida al sitio según las instrucciones del fabricantes (Stratagene, LaJolla, CA, n.º de cat. 200523). Se cortó el clon resultante con las enzimas de restricción NdeI y Hind III y se subclonó de vuelta en el vector pET-SUMO (Invitrogen, Carlsbad, C A). Se muestran las diversas variantes de deleción N-terminal en la tabla 3 a continuación:

Tabla 3: Secuencia de aminoácidos de variantes de IL-1F9

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos N-terminal de variantes de IL-1F9 (... indica aminoácidos intermedios de Il-1F9 humana (SEQ ID NO 4); () indica que se elimina el aminoácido encerrado; FLAG indica la secuencia de aminoácidos DYKDDDDK; polyHis indica una cadena de múltiples histidinas; normalmente de 6)	Polipéptidos de variantes de IL-1F9 (Hu indica humano; WT indica polipéptido de tipo natural de longitud completa; FpH indica una cola de FLAG-poli-His, la letra y el número en negrita, cursiva y mayúscula se refiere al aminoácido y su posición en SEQ ID NO 4 en la que la posición es en relación con el aminoácido N-terminal en la posición uno de SEQ ID NO 4.)
33	MRGTPGDADGGGRAVYQSMCKPITGT...FELNIND-FLAG-polyHis	HuIL-1F9WT/FpH
34	(M) SMCKPITGT...FELNIND-FLAG-polyHis	HuIL-1F9***S18***/FpH
35	MMCKPITGT...FELNIND-FLAG-polyHis	HuIL-1F9***M19***/FpH
36	(M)CKPITGT...FELNIND-FLAG-polyHis	HuIL-1F9***C20***/FpH
37	SMCKPITGT...FELNIND	HuIL-1F9***S18***

Se expresaron los constructos en *E. coli*, y se purificaron los polipéptidos expresados a partir de lisados bacterianos (fracción soluble) tal como se describió previamente. De manera similar a las observaciones para HuIL-1F8, la secuenciación N-terminal indicó que, para un constructo HuIL-IF9C20/FpH), se eliminó la Met N-terminal del polipéptido. También se sometieron a prueba polipéptidos purificados para determinar la actividad en un ensayo con indicador sustancialmente tal como se describe en el ejemplo 2. Se muestran los resultados en la tabla 5 a continuación.

Se introdujo el constructo de pH-SUMO, que codifica para HuIL-IF9S18 en *E. coli* DH10B. Se llevó a cabo la expresión usando el sistema de autoinducción Overnight Express™ (Novagen, Darmstadt, Alemania, n.º de cat. 71300-3) según el protocolo del fabricante. Se centrifugaron las células de *E. coli* y se congelaron. Se descongelaron los sedimentos celulares de *E. coli* congelados en TBS preparado en cóctel de inhibidores de proteasa libre de EDTA completo de Roche. Tras la descongelación, se añadió benzonasa. Se lisaron las células mediante su paso a través de un dispositivo 110L microfluidizador de Microfluidics (MFIC Corporation, Newton, MA) y se clarificaron los lisados resultantes mediante centrifugación. Se sometieron a filtración esterilizante los sobrenadantes y se cargaron sobre 5 ml de columnas de Ni-Sepharose HisTrap (GE Biosciences, Piscataway, NJ) equilibradas en Tris, NaCl, imidazol pH 7,4. Se lavaron las columnas con imidazol en TBS. Se eluyó la proteína con un gradiente lineal de imidazol. Se combinaron las fracciones eluidas y se dializaron en PBS usando casetes de diálisis Slide-A-Lyzers de MWCO (Pierce Biotechnology, Inc., Rockland, IL). Se usó SUMO-proteasa-1 de LifeSensors para escindir la pareja

de fusión de His-SUMO de la variante de IL-1F6. Se dializaron los productos de la reacción de escisión en TBS que contenía EDTA, pH 7,4 usando casetes de diálisis Slide-A-Lyzers de MWCO. Entonces se hicieron pasar las combinaciones dializadas de vuelta por las columnas de Ni-Sepharose HisTrap y se conservaron las fracciones no retenidas que contenían la variante de IL-1F6 liberada pura, y se sometieron a prueba para determinar la actividad tal como se describe en el ejemplo 2B a continuación. Se muestran los resultados en la tabla 7 a continuación.

Ejemplo 1D: Preparación de variantes de IL-1F5

Se prepararon Variantes de IL-1F5 que comprendían una cola de FLAG-poliHis C-terminal de manera sustancialmente similar a como se describe en el ejemplo 1A anterior, usando como molde un clon de ADNc que codifica para hulL-1F5 (AF201830). HulL-1F5V2, usando como molde un clon de ADNc que codifica para hulL-1F5 (AF201830), se preparó y se purificó de manera sustancialmente similar a HulL-1F6***K6*** descrito en el ejemplo 1A. Se muestran las diversas variantes de deleción N-terminal en la tabla 4 a continuación:

Tabla 4: Secuencia de aminoácidos de variantes de IL-1F5

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos N-terminal de variantes de IL-1F5 (... indica aminoácidos intermedios de Il-1F5 humana (SEQ ID NO 1); () indica que se elimina el aminoácido encerrado; FLAG indica la secuencia de aminoácidos DYKDDDDK; polyHis indica una cadena de múltiples histidinas; normalmente de aproximadamente 6)	Polipéptidos de variantes de IL-1F5 (Hu indica humano; WT indica polipéptido de tipo natural de longitud completa; FpH indica una cola de FLAG-poli-His, la letra y el número en negrita, cursiva y mayúscula se refiere al aminoácido y su posición en SEQ ID NO 1 en la que la posición es en relación con el aminoácido N-terminal en la posición uno de SEQ ID NO 1.)
38	MVLSGALCFRMKDSA... FYFQQCD-FLAG-polyHis	HulL-1F5***M1***/FpH
39	(M)VLSGALCFRMKDSA... FYFQQCD-FLAG-polyHis	HulL-1F5***V2***/FpH
40	MLSGALCFRMKDSA... FYFQQCD-FLAG-polyHis	HulL-1F5***L3***/FpH
41	(M)SGALCFRMKDSA... FYFQQCD-FLAG-polyHis	HulL-1F5***S4***/FpH
42	(M)GALCFRMKDSA... FYFQQCD-FLAG-polyHis	HulL-1F5***G5***/FpH
43	VLSGALCFRMKDSA... FYFQQCD	HulL-1F5***V2***

Se expresó HulL-1F5M1/FpH en *E. coli* como fusión con glutatión-S-transferasa (a continuación en el presente documento "GST"). Se escindió el dominio GST mediante digestión con factor Xa. Se expresó HulL-1F5V2/FpH en células COS-1. Se expresaron los constructos restantes tal como se describió anteriormente. También se expresó una forma de longitud completa en *E. coli*, y se encontró que tenía la misma secuencia N-terminal que HulL-1F5V2FpH; esta forma se denominó HulL-1F5WT/FpH. Se purificaron los polipéptidos y se sometieron a prueba para determinar su capacidad para inhibir la activación de IL-1Rrp2 por IL-1F8 en un ensayo con indicador sustancialmente tal como se describe en el ejemplo 2. En este ensayo, se añadió cada variante de IL-1F5 purificada a células Jurkat transfectadas con IL-1Rrp2 a 5000, 500 ó 50 ng/ml, y se preincubaron las células durante 15 minutos. En ese momento, se añadió IL-1F8 (sin cola, de longitud completa - expresada en *E. coli*; HulL-1F8WT/FpH) a una concentración de 150 ng/ml. Entonces se incubaron las células con las mezclas de F8/F5 durante cinco horas a 37°C. Se sometieron a ensayo los lisados celulares para determinar la actividad luciferasa tal como se notificó previamente (Towne *et al.* 2004 J Biol Chem 279(14):13677)). Las razones de F5:F8 sometidas a prueba fueron de 33,3:1, 3,3:1 y 0,33:1. Se muestran los resultados en la tabla 5 a continuación.

Se introdujo el constructo de pH-SUMO, que codifica para IML-1FK2 en E. coli DH10B. Se llevó a cabo la expresión usando el sistema de autoinducción Overnight Express™ (Novagen, Darmstadt, Alemania, n.º de cat. 71300-3) según el protocolo del fabricante. Se centrifugaron las células de E. coli y se congelaron. Se descongelaron los sedimentos celulares de E. coli congelados en TBS preparado en cóctel de inhibidores de proteasa libre de EDTA completo de Roche. Tras la descongelación, se añadió benzonasa. Se lisaron las células mediante su paso a través de un dispositivo 110L microfluidizador de Microfluidics (MFIC Corporation, Newton, MA) y se clarificaron los lisados resultantes mediante centrifugación. Se sometieron a filtración esterilizante los sobrenadantes y se cargaron sobre 5 ml de columnas de Ni-Sepharose HisTrap (GE Biosciences, Piscataway, NJ) equilibradas en Tris, NaCl, imidazol pH 7,4. Se lavaron las columnas con imidazol en TBS. Se eluyó la proteína con un gradiente lineal de imidazol. Se combinaron las fracciones eluidas y se dializaron en PBS usando casetes de diálisis Slide-A-Lyzers de MWCO (Pierce Biotechnology, Inc., Rockland, IL). Se usó Se usó SUMO-proteasa-1 de LifeSensors para escindir la pareja de fusión de His-SUMO de la variante de IL-1F6. Se dializaron los productos de la reacción de escisión en TBS que contenía EDTA, pH 7,4 usando casetes de diálisis Slide-A-Lyzers de MWCO. Entonces se hicieron pasar las combinaciones dializadas de vuelta por las columnas de Ni-Sepharose HisTrap y se conservaron las fracciones no retenidas que contenían la variante de IL-1F6 liberada pura, y se sometieron a prueba para determinar la actividad tal como se describe en el ejemplo 2B a continuación. Se muestran los resultados en la tabla 7 a continuación.

EJEMPLO 2

Ejemplo 2A: Ensayo de luciferasa de variantes de IL-1F

Este ejemplo describe un ensayo con indicador usado para evaluar la actividad de variantes de miembros de la familia de IL-1, sustancialmente tal como se describe en Towne *et al.*, J Biol Chem. 279(14):13677 (2004) incorporado al presente documento como referencia en su totalidad. Brevemente, se transfectan de manera transitoria células Jurkat E6.1 (7 X 10^5 mediante FuGENE 6 (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) según el protocolo del fabricante (es decir, se transfectan las células con 200 ng de plásmido indicador y 400 ng de o bien plásmidos vector vacíos o bien que codifican para IL-1Rrp2 con una razón de ADN/FuGENE 6 1:3). Diecisiete horas tras la transfección, se estimulan las células con las citocinas o variantes de citocina indicadas durante cinco horas. Se lisan las células y se evalúa la actividad luciferasa usando tampón de lisis con indicador (Promega) y reactivo del ensayo de luciferasa (Promega). Los resultados notificados en el presente documento representan muestras por duplicado.

Tabla 5

variante de HuIL-1F	Secuencia N-terminal	SEQ ID NO:	Actividad biológica*	Posición de inicio de la variante**
HuIL-1F5***M1***/FpH	~~~~~~~~MVLSGALCFR[M]KDSALKVLYLHNN	44	ninguna	-10
HuIL-1F5***V2***/FpH	~~~~~~~~~VLSGALCFR[M]KDSALKVLYLHNN	45	>FL	-9
HuIL-1F5***L3***/FpH	~~~~~~~~~MLSGALCFR[M]KDSALKVLYLHNN	46	>FL	-9
HuIL-1F5***S4***/FpH	~~~~~~~~~~~SGALCFR[M]KDSALKVLYLHNN	47	ninguna	-7
HuIL-1F5***G5***/FpH	~~~~~~~~~~~~GALCFR[M]KDSALKVLYLHNN	48	ninguna	-6
HuIL-1F6***K6***/FpH	~~~~~~~~MKIDTPQRGS[I]QDINHRVWVLQDQ	49	=FL	-10
HuIL-1F6***I7***/FpH	~~~~~~~~~MIDTPQRGS[I]QDINHRVWVLQDQ	50	>>FL	-9
HuIL-1F6***D8***/FpH	~~~~~~~~~~MDTPQRGS[I]QDINHRVWVLQDQ	51	=FL	-8
HuIL-1F8***Q4***/FpH	~~~~~~~MQREAAPKSYA[I]RDSRQMVWVLSGN	52	=FL	-11
HuIL-1F8***R5***/FpH	~~~~~~~~MREAAPKSYA[I]RDSRQMVWVLSGN	53	=FL	-10
HuIL-1F8***E6***/FpH	~~~~~~~~~MEAAPKSYA[I]RDSRQMVWVLSGN	54	>>FL	-9
HuIL-1F8***A7***/FpH	~~~~~~~~~~AAPKSYA[I]RDSRQMVWVLSGN	55	<FL	-7
HuIL-1F9***S18***/FpH	~~~~~~~~~SMCKPITGT[I]NDLNQQVWTLQGQ	56	>>FL	-9
HuIL-1F9***M19***/FpH	~~~~~~~~~MMCKPITGT[I]NDLNQQVWTLQGQ	57	>>FL	-9
HuIL-1F9***C20***/FpH	~~~~~~~~~~CKPITGT[I]NDLNQQVWTLQGQ	58	<FL	-7

* La actividad biológica se expresa con relación a la actividad del polipéptido de longitud completa relevante (FL).

** Indica la posición del aminoácido N-terminal de la variante con relación a la metionina o isoleucina de la secuencia consenso @XD. El residuo alifático (met o ile) se indica encerrándolo en un recuadro.

El análisis de estos resultados indicó que todas las variantes con actividad potenciada con relación al miembro de la familia de IL-1 de longitud completa relevante tienen una secuencia N-terminal que se inicia en la posición -9 con relación al aminoácido alifático de la secuencia consenso @XD (el aminoácido alifático se muestra como una '@' en la secuencia consenso de la figura 1 y se encierra en un recuadro en las secuencias de la tabla 5 anterior). Había suficientes puntos de datos disponibles para algunos de los constructos para permitir el cálculo de los valores de CE_{50}; para los constructos restantes, los datos eran insuficientes para tales cálculos. Se muestran los constructos relevantes y sus CE_{50} en la tabla 6 a continuación.

Tabla 6

IL-1	Polipéptido sometido a ensayo	CE_{50} (ng/ml)	Polipéptido sometido a ensayo	CE_{50} (ng/ml)	Variantes sometidas a ensayo	CE_{50} (ng/ml)

F6	HuF6WT (sin cola)	>212	HuF6WT/FpH	>136	HuF6I7/FpH	2,8
F8	HuF8WT (sin cola)	>193	HuF8WT/FpH	>258	HuF8I7/FpH	0,2
F9	HuF9WT (sin cola)	>544	HuF9WT/FpH	>332	HuF9S718/FpH HuF9M19/FpH	1,0 1,1

Estos resultados demostraron que la longitud del extremo N-terminal es importante para determinar la actividad biológica de miembros de la familia de IL-1 tanto agonistas como antagonistas que señalizan mediante IL-1Rrp2.

Ejemplo 2B: Ensayo de ELISA IL-8 de variantes de IL-1F

Se generó una línea celular estable que expresaba IL-1Rrp2 humana fuera de un promotor inducible en células Jurkat T-REx™ (Invitrogen). Las líneas celulares T-REx™ expresan de manera estable la proteína represora de tetraciclina y, por tanto, permiten la expresión inducible del gen de interés (IL-1Rrp2) con doxiciclina.

Para acceder a la actividad de los ligandos de IL-1F, se indujeron células Jurkat T-REx™ que expresan IL-1Rrp2 con doxiciclina 24 h antes de su uso. Se sembraron las células a 200.000 células/pocillo en una placa de cultivo tisular de fondo redondo de 96 pocillos. Se añadieron los ligandos de IL-1F (proteína de longitud completa (WT) sin cola, de longitud completa (WT) con cola, con cola truncada o sin cola truncada generada por SUMO) a los pocillos tal como sigue: se añadieron IL-1F6, F8 y F9 de longitud completa a 50 μg/ml con una serie de dilución de 8 puntos a diluciones 1:5 y se inició con los ligandos truncados a 2 μg/ml con diluciones 1:5 para 8 puntos. Se incubaron las células con los ligandos a 37°C, 5% de CO_2 durante 24 h. Tras la incubación, se centrifugaron las células y se recogieron los sobrenadantes para análisis usando el kit de ELISA para IL-8 humana QuantiGlo (R&D Systems) según las instrucciones del fabricante. Se facilitan los resultados para los polipéptidos y las variantes sometidos a prueba tal como se indica en la tabla 7 a continuación.

Tabla 7: Resultados del ensayo de ELISA IL-8

SEQ ID NO:	Polipéptido sometido a ensayo	Secuencia de polipéptido N-terminal Una caja enmarca el aminoácido alifático que se indica como @ de la secuencia consenso: @XD en la que @ puede ser M o I, y X es un aminoácido.	CE_{50} (μg/ml)
59	HuIL-1F6WT	MEKALKIDTPQQGSIQDINHRVWVLQDQ	12,94
50	HuIL-1F6*I7*/FpH	~~~~~MIDTPQRGSIQDINHRVWVLQDQ	0,060
60	HuIL-1F6*K6*	~~~~~KIDTPQQGSIQDINHRVWVLQDQ	0,000164
61	HuIL-1F8WT	MNPQREAAPKSYAIRDSRQMVWVLSGN	10,47
54	HuIL-1F8*E6*/FpH	~~~~~MEAAPKSYAIRDSRQMVWVLSGN	0,002
62	HuIL-1F8*R5*	~~~~~REAAPKSYAIRDSRQMVWVLSGN	0,000129
63	HuIL-1F9 WT	MRGTPGDADGGGRAVYQSMCKPITGTINDLNQQVWTLQGQ	4,072
56	HuIL-1F9*S18*/FpH	~~~~~~~~~~~~~~~~~~SMCKPITGTINDLNQQVWTLQGQ	0,017
56	HuIL-1F9*S18*	~~~~~~~~~~~~~~~~~~SMCKPITGTINDLNQQVWTLQGQ	0,001

Estos resultados demostraron que la longitud del extremo N-terminal es importante para la actividad biológica de miembros de la familia de IL-1 tanto agonistas como antagonistas que señalizan mediante IL-1Rrp2 y que el aminoácido N-terminal particular no es importante. Además, estos resultados demuestran que los polipéptidos que no comprenden una cola C-terminal son más activos que los correspondientes polipéptidos que comprenden una cola C-terminal.

EJEMPLO 3

Preparación de anticuerpos monoclonales

Pueden emplearse polipéptidos de miembros de la familia de IL-1 como inmunógenos en la generación de anticuerpos monoclonales mediante técnicas convencionales, por ejemplo, técnicas descritas en la patente estadounidense 5.599.905, incorporada al presente documento como referencia. Se reconoce que pueden emplearse los polipéptidos en diversas formas como inmunógenos, por ejemplo, proteínas de longitud completa, fragmentos de las mismas, proteínas de fusión de las mismas tales como fusiones Fc, células que expresan la proteína recombinante en la superficie celular, etc. Los ejemplos de péptidos útiles incluyen los mostrados en la figura 1.

Para resumir un ejemplo de un procedimiento de este tipo, se conjuga un péptido N-terminal de un miembro de la familia de IL-1 que requiere IL-1Rrp2, opcionalmente que tiene un residuo de cisteína C-terminal adicional para

facilitar la conjugación, con hemocianina de lapa californiana (KLH; que puede obtenerse, por ejemplo, de Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL) activada con maleiimida para producir un inmunógeno. Para una primera inmunización, se emulsionan 100 microgramos de inmunógeno (que contenía 50 microgramos de péptido) en adyuvante completo de Freund (CFA) a una razón en volumen 1:1 y se inyectaron por vía subcutánea en un volumen final de 200 microlitros para cada ratón.

Se realizó una inmunización de refuerzo de los animales inmunizados de tres a cuatro veces más con inmunógeno adicional para aumentar la respuesta específica de antígeno, a intervalos de dos a cuatro semanas (aunque pueden emplearse intervalos más largos. Por ejemplo, se inyecta una segunda inyección de 50 microgramos de inmunógeno (que contiene 25 microgramos de péptido) mezclado con adyuvante incompleto de Freund en un volumen final de 200 ul por vía subcutánea a cada ratón aproximadamente cuatro semanas tras la inmunización primaria. Puede administrarse una tercera inyección (20 microgramos de inmunógeno que contiene 10 microgramos de péptido mezclado con un adyuvante tal como adyuvante Ribi) por vía subcutánea y/o intraperitoneal desde aproximadamente de 10 a 30 días tras la segunda inyección. Si se desea, puede administrarse una cuarta inyección (20 microgramos de inmunógeno que contiene 10 microgramos de péptido mezclado con adyuvante incompleto de Freund) por vía subcutánea y/o intraperitoneal desde aproximadamente 14 a aproximadamente 28 días tras la tercera inyección. Se administra una inyección final, habitualmente cinco días aproximadamente antes de la fusión, utilizando 50 microgramos de inmunógeno que contiene 25 microgramos de péptido en PBS, mediante inyección intraperitoneal.

Pueden tomarse periódicamente muestras de suero mediante extracción de sangre retroorbital o escisión en la punta de la cola para someterlas a prueba mediante ELISA de péptidos (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), u otro ensayo adecuado, para evaluar el título de anticuerpos. En el momento de la fusión, se sacrifican los animales, se recogen los esplenocitos y se fusionan a la línea celular de mieloma murino SP2/O (ATCC CRL 1581). Se siembran las líneas celulares de hibridoma resultantes en múltiples placas de microtitulación en un medio selectivo HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para facilitar la proliferación de células híbridas de mieloma-células de bazo.

Se seleccionan los clones de hibridoma así generados para determinar la reactividad con la parte N-terminal del miembro de la familia de IL-1 relevante. La selección inicial de sobrenadantes de hibridoma puede utilizar un ELISA de péptidos, un ELISA de células completas y/o un ensayo basado en células adecuado para la selección de alto rendimiento (tecnología de ensayo de microvolumen fluorométrico o FMAT, sustancialmente tal como se describe por Fiscella, *et al.*, Nature Biotechnology 21:302-307 (2003). Además, pueden cultivarse hibridomas que son positivos en este método de selección para proporcionar mayores cantidades de anticuerpo, que entonces puede purificarse tal como se describe a continuación y seleccionarse mediante ensayo(s) basado(s) en células adicional(es) (por ejemplo, un ensayo con indicador, u otro ensayo para determinar la actividad biológica de un miembro de la familia de IL-1).

Además, pueden clonarse hibridomas seleccionados y someterse a prueba para garantizar la producción estable del anticuerpo monoclonal. Pueden cultivarse hibridomas *in vitro*, o envejecerse por pasar como líquido ascítico en mamíferos huésped adecuados. Pueden purificarse los anticuerpos monoclonales resultantes mediante precipitación con sulfato de amonio seguido por cromatografía de exclusión en gel y/o cromatografía de afinidad basándose en la unión del anticuerpo a proteína G, por ejemplo.

EJEMPLO 4

Purificación de anticuerpos de hibridoma para selección

Se cultivan células de hibridoma durante un tiempo y en condiciones para producir una muestra de aproximadamente 35 ml de fluido sobrenadante de hibridoma. A cada muestra se le añaden 12 ml de tampón de unión a proteína A 4X (ácido cítrico 1,6 M, tris 100 mM, pH 9,15) y aproximadamente 300 µl de una suspensión al 67% de medios MabSelect™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Se hace rotar suavemente la suspensión resultante durante la noche a 4ºC.

Tras la incubación durante la noche, se centrifugan las muestras para sedimentar la resina y los anticuerpos monoclonales unidos a la misma, por ejemplo a 2.000 RPM en un rotor de centrífuga G3.8 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) durante 5 minutos a 4ºC sin freno. Se retira todo excepto aproximadamente 300 µl del fluido sobrenadante y se resuspende la resina para formar una suspensión concentrada.

Se transfiere la suspensión concentrada a un tubo de microcentrífuga y se añade suficiente tampón de unión a proteina A 1X (ácido cítrico 400 mM, tris 25 mM, pH 8,9) para llevar el volumen total hasta aproximadamente 1 ml. Se resuspende la suspensión, entonces se centrifuga a aproximadamente 14.000 g durante 5 segundos. Se retira el fluido sobrenadante del sedimento resultante, que se lava un total de tres veces de manera similar (es decir, mediante su resuspensión en aproximadamente 1 ml de tampón de unión a proteina A 1X, centrifugación, retirada del sobrenadante y resuspensión en tampón nuevo).

Tras tres lavados, se resuspende el sedimento en 400 µl de tampón de elución (ácido fórmico 200 mM) y se agita

durante 10 min. a temperatura ambiente, luego se centrifuga a 14.000 g durante 5 segundos. Se retira cuidadosamente el sobrenadante como eluato, y se eluye de nuevo el sedimento de manera similar a la descrita anteriormente durante un total de tres ciclos de elución. Se combinan los eluatos de los tres ciclos de elución, se centrifugan a 14.000 g durante 5 min., temperatura ambiente y se transfieren a un tubo nuevo. Se ajusta el pH a 7,8-8,2 añadiendo base de tris 2 M (235 mM_f) y se mezcla rápidamente. Se centrifugan de nuevo las muestras a 14.000 g durante 5 min. a temperatura ambiente, y se designan como solubles con cambio de pH. Se ejecuta un barrido espectral de cada muestra (diluida añadiendo 20 µl de la muestra a 700 µl de agua) desde 250 hasta 350 nm, y se verifica la concentración de proteína cargando 0,5 µg de cada muestra que contenía anticuerpo en un gel de SDS-PAGE al 4 -20% reductor con patrones de anticuerpo apropiados.

Lista de secuencias

<110> AMGEN INC.

<120> Variantes de la familia de IL-1

<130> EP64194HVapu

<140> aún sin asignar

<141> adjunto al presente documento

<150> Documento PCT/US2007/019713

<151> 10-09-2007

<150> Documento US 60 843 311

<151> 08-09-2006

<160> 78

<170> PatenIn versión 3.3

<210> 1

<211> 155

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Met Val Leu Ser Gly Ala Leu Cys Phe Arg Met Lys Asp Ser Ala Leu
1 5 10 15

Lys Val Leu Tyr Leu His Asn Asn Gln Leu Leu Ala Gly Gly Leu His
20 25 30

Ala Gly Lys Val Ile Lys Gly Glu Glu Ile Ser Val Val Pro Asn Arg
35 40 45

Trp Leu Asp Ala Ser Leu Ser Pro Val Ile Leu Gly Val Gln Gly Gly
50 55 60

Ser Gln Cys Leu Ser Cys Gly Val Gly Gln Glu Pro Thr Leu Thr Leu
65 70 75 80

Glu Pro Val Asn Ile Met Glu Leu Tyr Leu Gly Ala Lys Glu Ser Lys
85 90 95

Ser Phe Thr Phe Tyr Arg Arg Asp Met Gly Leu Thr Ser Ser Phe Glu
100 105 110

Ser Ala Ala Tyr Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Val Pro Glu Ala Asp
115 120 125

Gln Pro Val Arg Leu Thr Gln Leu Pro Glu Asn Gly Gly Trp Asn Ala
130 135 140

Pro Ile Thr Asp Phe Tyr Phe Gln Gln Cys Asp
145 150 155

<210> 2

<211> 158

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

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

Asp Ile Asn His Arg Val Trp Val Leu Gln Asp Gln Thr Leu Ile Ala
20 25 30

Val Pro Arg Lys Asp Arg Met Ser Pro Val Thr Ile Ala Leu Ile Ser
35 40 45

Cys Arg His Val Glu Thr Leu Glu Lys Asp Arg Gly Asn Pro Ile Tyr
50 55 60

Leu Gly Leu Asn Gly Leu Asn Leu Cys Leu Met Cys Ala Lys Val Gly
65 70 75 80

Asp Gln Pro Thr Leu Gln Leu Lys Glu Lys Asp Ile Met Asp Leu Tyr
85 90 95

Asn Gln Pro Glu Pro Val Lys Ser Phe Leu Phe Tyr His Ser Gln Ser
100 105 110

Gly Arg Asn Ser Thr Phe Glu Ser Val Ala Phe Pro Gly Trp Phe Ile
115 120 125

Ala Val Ser Ser Glu Gly Gly Cys Pro Leu Ile Leu Thr Gln Glu Leu
130 135 140

Gly Lys Ala Asn Thr Thr Asp Phe Gly Leu Thr Met Leu Phe
145 150 155

<210> 3

<211> 157

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Met Asn Pro Gln Arg Glu Ala Ala Pro Lys Ser Tyr Ala Ile Arg Asp
1 5 10 15

Ser Arg Gln Met Val Trp Val Leu Ser Gly Asn Ser Leu Ile Ala Ala
20 25 30

Pro Leu Ser Arg Ser Ile Lys Pro Val Thr Leu His Leu Ile Ala Cys
35 40 45

Arg Asp Thr Glu Phe Ser Asp Lys Glu Lys Gly Asn Met Val Tyr Leu
50 55 60

Gly Ile Lys Gly Lys Asp Leu Cys Leu Phe Cys Ala Glu Ile Gln Gly
65 70 75 80

Lys Pro Thr Leu Gln Leu Lys Glu Lys Asn Ile Met Asp Leu Tyr Val
85 90 95

Glu Lys Lys Ala Gln Lys Pro Phe Leu Phe Phe His Asn Lys Glu Gly
100 105 110

Ser Thr Ser Val Phe Gln Ser Val Ser Tyr Pro Gly Trp Phe Ile Ala
115 120 125

Thr Ser Thr Thr Ser Gly Gln Pro Ile Phe Leu Thr Lys Glu Arg Gly
130 135 140

Ile Thr Asn Asn Thr Asn Phe Tyr Leu Asp Ser Val Glu
145 150 155

<210> 4

<211> 169

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Met Arg Gly Thr Pro Gly Asp Ala Asp Gly Gly Gly Arg Ala Val Tyr
1 5 10 15

Gln Ser Met Cys Lys Pro Ile Thr Gly Thr Ile Asn Asp Leu Asn Gln
20 25 30

Gln Val Trp Thr Leu Gln Gly Gln Asn Leu Val Ala Val Pro Arg Ser
35 40 45

Asp Ser Val Thr Pro Val Thr Val Ala Val Ile Thr Cys Lys Tyr Pro
50 55 60

Glu Ala Leu Glu Gln Gly Arg Gly Asp Pro Ile Tyr Leu Gly Ile Gln
65 70 75 80

Asn Pro Glu Met Cys Leu Tyr Cys Glu Lys Val Gly Glu Gln Pro Thr
85 90 95

Leu Gln Leu Lys Glu Gln Lys Ile Met Asp Leu Tyr Gly Gln Pro Glu
100 105 110

Pro Val Lys Pro Phe Leu Phe Tyr Arg Ala Lys Thr Gly Arg Thr Ser
115 120 125

Thr Leu Glu Ser Val Ala Phe Pro Asp Trp Phe Ile Ala Ser Ser Lys
130 135 140

Arg Asp Gln Pro Ile Ile Leu Thr Ser Glu Leu Gly Lys Ser Tyr Asn
145 150 155 160

Thr Ala Phe Glu Leu Asn Ile Asn Asp
165

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido FLAG

<400> 5

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 6

<211> 154

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

Val Leu Ser Gly Ala Leu Cys Phe Arg Met Lys Asp Ser Ala Leu Lys
1 5 10 15

Val Leu Tyr Leu His Asn Asn Gln Leu Leu Ala Gly Gly Leu His Ala
20 25 30

Gly Lys Val Ile Lys Gly Glu Glu Ile Ser Val Val Pro Asn Arg Trp
35 40 45

Leu Asp Ala Ser Leu Ser Pro Val Ile Leu Gly Val Gln Gly Gly Ser
50 55 60

Gln Cys Leu Ser Cys Gly Val Gly Gln Glu Pro Thr Leu Thr Leu Glu
65 70 75 80

Pro Val Asn Ile Met Glu Leu Tyr Leu Gly Ala Lys Glu Ser Lys Ser
85 90 95

Phe Thr Phe Tyr Arg Arg Asp Met Gly Leu Thr Ser Ser Phe Glu Ser
100 105 110

Ala Ala Tyr Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Val Pro Glu Ala Asp Gln
115 120 125

Pro Val Arg Leu Thr Gln Leu Pro Glu Asn Gly Gly Trp Asn Ala Pro
130 135 140

Ile Thr Asp Phe Tyr Phe Gln Gln Cys Asp
145 150

<210> 7

<211> 165

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (155)..(162)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (163)..(165)

<223> Cola de poliHis

<400> 7

```
Met Leu Ser Gly Ala Leu Cys Phe Arg Met Lys Asp Ser Ala Leu Lys
1               5                   10                  15

Val Leu Tyr Leu His Asn Asn Gln Leu Leu Ala Gly Gly Leu His Ala
            20                  25                  30

Gly Lys Val Ile Lys Gly Glu Glu Ile Ser Val Val Pro Asn Arg Trp
        35                  40                  45

Leu Asp Ala Ser Leu Ser Pro Val Ile Leu Gly Val Gln Gly Gly Ser
    50                  55                  60

Gln Cys Leu Ser Cys Gly Val Gly Gln Glu Pro Thr Leu Thr Leu Glu
65                  70                  75                  80

Pro Val Asn Ile Met Glu Leu Tyr Leu Gly Ala Lys Glu Ser Lys Ser
                85                  90                  95

Phe Thr Phe Tyr Arg Arg Asp Met Gly Leu Thr Ser Ser Phe Glu Ser
            100                 105                 110

Ala Ala Tyr Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Val Pro Glu Ala Asp Gln
        115                 120                 125

Pro Val Arg Leu Thr Gln Leu Pro Glu Asn Gly Gly Trp Asn Ala Pro
    130                 135                 140

Ile Thr Asp Phe Tyr Phe Gln Gln Cys Asp Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
145                 150                 155                 160

Asp Lys His His His
                165
```

<210> 8

<211> 154

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Met Leu Ser Gly Ala Leu Cys Phe Arg Met Lys Asp Ser Ala Leu Lys
1 5 10 15

Val Leu Tyr Leu His Asn Asn Gln Leu Leu Ala Gly Gly Leu His Ala
20 25 30

Gly Lys Val Ile Lys Gly Glu Glu Ile Ser Val Val Pro Asn Arg Trp
35 40 45

Leu Asp Ala Ser Leu Ser Pro Val Ile Leu Gly Val Gln Gly Gly Ser
50 55 60

Gln Cys Leu Ser Cys Gly Val Gly Gln Glu Pro Thr Leu Thr Leu Glu
65 70 75 80

Pro Val Asn Ile Met Glu Leu Tyr Leu Gly Ala Lys Glu Ser Lys Ser
85 90 95

Phe Thr Phe Tyr Arg Arg Asp Met Gly Leu Thr Ser Ser Phe Glu Ser
100 105 110

Ala Ala Tyr Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Val Pro Glu Ala Asp Gln
115 120 125

Pro Val Arg Leu Thr Gln Leu Pro Glu Asn Gly Gly Trp Asn Ala Pro
130 135 140

Ile Thr Asp Phe Tyr Phe Gln Gln Cys Asp
145 150

<210> 9

<211> 165

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (155)..(162)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (163)..(165)

<223> Cola de poliHis

<400> 9

Met Leu Ser Gly Ala Leu Cys Phe Arg Met Lys Asp Ser Ala Leu Lys
1 5 10 15

Val Leu Tyr Leu His Asn Asn Gln Leu Leu Ala Gly Gly Leu His Ala
20 25 30

Gly Lys Val Ile Lys Gly Glu Glu Ile Ser Val Val Pro Asn Arg Trp
35 40 45

Leu Asp Ala Ser Leu Ser Pro Val Ile Leu Gly Val Gln Gly Gly Ser
50 55 60

Gln Cys Leu Ser Cys Gly Val Gly Gln Glu Pro Thr Leu Thr Leu Glu
65 70 75 80

Pro Val Asn Ile Met Glu Leu Tyr Leu Gly Ala Lys Glu Ser Lys Ser
85 90 95

Phe Thr Phe Tyr Arg Arg Asp Met Gly Leu Thr Ser Ser Phe Glu Ser
100 105 110

Ala Ala Tyr Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Val Pro Glu Ala Asp Gln
115 120 125

Pro Val Arg Leu Thr Gln Leu Pro Glu Asn Gly Gly Trp Asn Ala Pro
130 135 140

Ile Thr Asp Phe Tyr Phe Gln Gln Cys Asp Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
145 150 155 160

Asp Lys His His His
165

<210> 10

<211> 153

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Lys Ile Asp Thr Pro Gln Gln Gly Ser Ile Gln Asp Ile Asn His Arg
1 5 10 15

Val Trp Val Leu Gln Asp Gln Thr Leu Ile Ala Val Pro Arg Lys Asp
20 25 30

Arg Met Ser Pro Val Thr Ile Ala Leu Ile Ser Cys Arg His Val Glu
35 40 45

Thr Leu Glu Lys Asp Arg Gly Asn Pro Ile Tyr Leu Gly Leu Asn Gly
50 55 60

Leu Asn Leu Cys Leu Met Cys Ala Lys Val Gly Asp Gln Pro Thr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Lys Glu Lys Asp Ile Met Asp Leu Tyr Asn Gln Pro Glu Pro
85 90 95

Val Lys Ser Phe Leu Phe Tyr His Ser Gln Ser Gly Arg Asn Ser Thr
100 105 110

Phe Glu Ser Val Ala Phe Pro Gly Trp Phe Ile Ala Val Ser Ser Glu
115 120 125

Gly Gly Cys Pro Leu Ile Leu Thr Gln Glu Leu Gly Lys Ala Asn Thr
130 135 140

Thr Asp Phe Gly Leu Thr Met Leu Phe
145 150

<210> 11

<211> 164

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (154)..(161)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (162)..(164)

<223> Cola de poliHis

<400> 11

Lys Ile Asp Thr Pro Gln Gln Gly Ser Ile Gln Asp Ile Asn His Arg
1 5 10 15

Val Trp Val Leu Gln Asp Gln Thr Leu Ile Ala Val Pro Arg Lys Asp
20 25 30

Arg Met Ser Pro Val Thr Ile Ala Leu Ile Ser Cys Arg His Val Glu
35 40 45

Thr Leu Glu Lys Asp Arg Gly Asn Pro Ile Tyr Leu Gly Leu Asn Gly
50 55 60

Leu Asn Leu Cys Leu Met Cys Ala Lys Val Gly Asp Gln Pro Thr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Lys Glu Lys Asp Ile Met Asp Leu Tyr Asn Gln Pro Glu Pro
85 90 95

Val Lys Ser Phe Leu Phe Tyr His Ser Gln Ser Gly Arg Asn Ser Thr
100 105 110

Phe Glu Ser Val Ala Phe Pro Gly Trp Phe Ile Ala Val Ser Ser Glu
115 120 125

Gly Gly Cys Pro Leu Ile Leu Thr Gln Glu Leu Gly Lys Ala Asn Thr
130 135 140

Thr Asp Phe Gly Leu Thr Met Leu Phe Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
145 150 155 160

Lys His His His

<210> 12

<211> 153

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

Met Ile Asp Thr Pro Gln Gln Gly Ser Ile Gln Asp Ile Asn His Arg
1 5 10 15

Val Trp Val Leu Gln Asp Gln Thr Leu Ile Ala Val Pro Arg Lys Asp
20 25 30

Arg Met Ser Pro Val Thr Ile Ala Leu Ile Ser Cys Arg His Val Glu
35 40 45

Thr Leu Glu Lys Asp Arg Gly Asn Pro Ile Tyr Leu Gly Leu Asn Gly
50 55 60

Leu Asn Leu Cys Leu Met Cys Ala Lys Val Gly Asp Gln Pro Thr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Lys Glu Lys Asp Ile Met Asp Leu Tyr Asn Gln Pro Glu Pro
85 90 95

Val Lys Ser Phe Leu Phe Tyr His Ser Gln Ser Gly Arg Asn Ser Thr
100 105 110

Phe Glu Ser Val Ala Phe Pro Gly Trp Phe Ile Ala Val Ser Ser Glu
115 120 125

Gly Gly Cys Pro Leu Ile Leu Thr Gln Glu Leu Gly Lys Ala Asn Thr
130 135 140

Thr Asp Phe Gly Leu Thr Met Leu Phe
145 150

<210> 13

<211> 164

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (154)..(161)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (162)..(164)

<223> Cola de poliHis

<400> 13

Met Ile Asp Thr Pro Gln Gln Gly Ser Ile Gln Asp Ile Asn His Arg
1 5 10 15

Val Trp Val Leu Gln Asp Gln Thr Leu Ile Ala Val Pro Arg Lys Asp
20 25 30

Arg Met Ser Pro Val Thr Ile Ala Leu Ile Ser Cys Arg His Val Glu
35 40 45

Thr Leu Glu Lys Asp Arg Gly Asn Pro Ile Tyr Leu Gly Leu Asn Gly
50 55 60

Leu Asn Leu Cys Leu Met Cys Ala Lys Val Gly Asp Gln Pro Thr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Lys Glu Lys Asp Ile Met Asp Leu Tyr Asn Gln Pro Glu Pro
85 90 95

Val Lys Ser Phe Leu Phe Tyr His Ser Gln Ser Gly Arg Asn Ser Thr
100 105 110

Phe Glu Ser Val Ala Phe Pro Gly Trp Phe Ile Ala Val Ser Ser Glu
115 120 125

Gly Gly Cys Pro Leu Ile Leu Thr Gln Glu Leu Gly Lys Ala Asn Thr
130 135 140

Thr Asp Phe Gly Leu Thr Met Leu Phe Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
145 150 155 160

Lys His His His

<210> 14

<211> 153

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 14

Arg Glu Ala Ala Pro Lys Ser Tyr Ala Ile Arg Asp Ser Arg Gln Met
1 5 10 15

Val Trp Val Leu Ser Gly Asn Ser Leu Ile Ala Ala Pro Leu Ser Arg
20 25 30

Ser Ile Lys Pro Val Thr Leu His Leu Ile Ala Cys Arg Asp Thr Glu
35 40 45

Phe Ser Asp Lys Glu Lys Gly Asn Met Val Tyr Leu Gly Ile Lys Gly
50 55 60

Lys Asp Leu Cys Leu Phe Cys Ala Glu Ile Gln Gly Lys Pro Thr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Lys Glu Lys Asn Ile Met Asp Leu Tyr Val Glu Lys Lys Ala
85 90 95

Gln Lys Pro Phe Leu Phe Phe His Asn Lys Glu Gly Ser Thr Ser Val
100 105 110

Phe Gln Ser Val Ser Tyr Pro Gly Trp Phe Ile Ala Thr Ser Thr Thr
115 120 125

Ser Gly Gln Pro Ile Phe Leu Thr Lys Glu Arg Gly Ile Thr Asn Asn
130 135 140

Thr Asn Phe Tyr Leu Asp Ser Val Glu
145 150

<210> 15

<211> 164

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (154)..(161)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (162)..(164)

<223> Cola de poliHis

<400> 15

Arg Glu Ala Ala Pro Lys Ser Tyr Ala Ile Arg Asp Ser Arg Gln Met
1 5 10 15

Val Trp Val Leu Ser Gly Asn Ser Leu Ile Ala Ala Pro Leu Ser Arg
20 25 30

Ser Ile Lys Pro Val Thr Leu His Leu Ile Ala Cys Arg Asp Thr Glu
35 40 45

Phe Ser Asp Lys Glu Lys Gly Asn Met Val Tyr Leu Gly Ile Lys Gly
50 55 60

Lys Asp Leu Cys Leu Phe Cys Ala Glu Ile Gln Gly Lys Pro Thr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Lys Glu Lys Asn Ile Met Asp Leu Tyr Val Glu Lys Lys Ala
85 90 95

Gln Lys Pro Phe Leu Phe Phe His Asn Lys Glu Gly Ser Thr Ser Val
100 105 110

Phe Gln Ser Val Ser Tyr Pro Gly Trp Phe Ile Ala Thr Ser Thr Thr
115 120 125

Ser Gly Gln Pro Ile Phe Leu Thr Lys Glu Arg Gly Ile Thr Asn Asn
130 135 140

Thr Asn Phe Tyr Leu Asp Ser Val Glu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
145 150 155 160

Lys His His His

<210> 16

<211> 153

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 16

Met Glu Ala Ala Pro Lys Ser Tyr Ala Ile Arg Asp Ser Arg Gln Met
1 5 10 15

Val Trp Val Leu Ser Gly Asn Ser Leu Ile Ala Ala Pro Leu Ser Arg
20 25 30

Ser Ile Lys Pro Val Thr Leu His Leu Ile Ala Cys Arg Asp Thr Glu
35 40 45

Phe Ser Asp Lys Glu Lys Gly Asn Met Val Tyr Leu Gly Ile Lys Gly
50 55 60

Lys Asp Leu Cys Leu Phe Cys Ala Glu Ile Gln Gly Lys Pro Thr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Lys Glu Lys Asn Ile Met Asp Leu Tyr Val Glu Lys Lys Ala
85 90 95

Gln Lys Pro Phe Leu Phe Phe His Asn Lys Glu Gly Ser Thr Ser Val
100 105 110

Phe Gln Ser Val Ser Tyr Pro Gly Trp Phe Ile Ala Thr Ser Thr Thr
115 120 125

Ser Gly Gln Pro Ile Phe Leu Thr Lys Glu Arg Gly Ile Thr Asn Asn
130 135 140

Thr Asn Phe Tyr Leu Asp Ser Val Glu
145 150

<210> 17

<211> 164

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (154)..(161)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (162)..(164)

<223> Cola de poliHis

<400> 17

Met Glu Ala Ala Pro Lys Ser Tyr Ala Ile Arg Asp Ser Arg Gln Met
1 5 10 15

Val Trp Val Leu Ser Gly Asn Ser Leu Ile Ala Ala Pro Leu Ser Arg
20 25 30

Ser Ile Lys Pro Val Thr Leu His Leu Ile Ala Cys Arg Asp Thr Glu
35 40 45

Phe Ser Asp Lys Glu Lys Gly Asn Met Val Tyr Leu Gly Ile Lys Gly
50 55 60

Lys Asp Leu Cys Leu Phe Cys Ala Glu Ile Gln Gly Lys Pro Thr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Lys Glu Lys Asn Ile Met Asp Leu Tyr Val Glu Lys Lys Ala
85 90 95

Gln Lys Pro Phe Leu Phe Phe His Asn Lys Glu Gly Ser Thr Ser Val
100 105 110

Phe Gln Ser Val Ser Tyr Pro Gly Trp Phe Ile Ala Thr Ser Thr Thr
115 120 125

Ser Gly Gln Pro Ile Phe Leu Thr Lys Glu Arg Gly Ile Thr Asn Asn
130 135 140

Thr Asn Phe Tyr Leu Asp Ser Val Glu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
145 150 155 160

Lys His His His

<210> 18

<211> 152

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 18

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

Val Trp Thr Leu Gln Gly Gln Asn Leu Val Ala Val Pro Arg Ser Asp
20 25 30

Ser Val Thr Pro Val Thr Val Ala Val Ile Thr Cys Lys Tyr Pro Glu
35 40 45

Ala Leu Glu Gln Gly Arg Gly Asp Pro Ile Tyr Leu Gly Ile Gln Asn
50 55 60

Pro Glu Met Cys Leu Tyr Cys Glu Lys Val Gly Glu Gln Pro Thr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Lys Glu Gln Lys Ile Met Asp Leu Tyr Gly Gln Pro Glu Pro
85 90 95

Val Lys Pro Phe Leu Phe Tyr Arg Ala Lys Thr Gly Arg Thr Ser Thr
100 105 110

Leu Glu Ser Val Ala Phe Pro Asp Trp Phe Ile Ala Ser Ser Lys Arg
115 120 125

Asp Gln Pro Ile Ile Leu Thr Ser Glu Leu Gly Lys Ser Tyr Asn Thr
130 135 140

Ala Phe Glu Leu Asn Ile Asn Asp
145 150

<210> 19

<211> 163

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (153)..(160)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (161)..(163)

<223> Cola de poliHis

<400> 19

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

Val Trp Thr Leu Gln Gly Gln Asn Leu Val Ala Val Pro Arg Ser Asp
20 25 30

Ser Val Thr Pro Val Thr Val Ala Val Ile Thr Cys Lys Tyr Pro Glu
35 40 45

Ala Leu Glu Gln Gly Arg Gly Asp Pro Ile Tyr Leu Gly Ile Gln Asn
50 55 60

Pro Glu Met Cys Leu Tyr Cys Glu Lys Val Gly Glu Gln Pro Thr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Lys Glu Gln Lys Ile Met Asp Leu Tyr Gly Gln Pro Glu Pro
85 90 95

Val Lys Pro Phe Leu Phe Tyr Arg Ala Lys Thr Gly Arg Thr Ser Thr
100 105 110

Leu Glu Ser Val Ala Phe Pro Asp Trp Phe Ile Ala Ser Ser Lys Arg
115 120 125

Asp Gln Pro Ile Ile Leu Thr Ser Glu Leu Gly Lys Ser Tyr Asn Thr
130 135 140

Ala Phe Glu Leu Asn Ile Asn Asp Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
145 150 155 160

His His His

<210> 20

<211> 152

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 20

Met Met Cys Lys Pro Ile Thr Gly Thr Ile Asn Asp Leu Asn Gln Gln
1 5 10 15

Val Trp Thr Leu Gln Gly Gln Asn Leu Val Ala Val Pro Arg Ser Asp
20 25 30

Ser Val Thr Pro Val Thr Val Ala Val Ile Thr Cys Lys Tyr Pro Glu
35 40 45

Ala Leu Glu Gln Gly Arg Gly Asp Pro Ile Tyr Leu Gly Ile Gln Asn
50 55 60

Pro Glu Met Cys Leu Tyr Cys Glu Lys Val Gly Glu Gln Pro Thr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Lys Glu Gln Lys Ile Met Asp Leu Tyr Gly Gln Pro Glu Pro
85 90 95

Val Lys Pro Phe Leu Phe Tyr Arg Ala Lys Thr Gly Arg Thr Ser Thr
100 105 110

Leu Glu Ser Val Ala Phe Pro Asp Trp Phe Ile Ala Ser Ser Lys Arg
115 120 125

Asp Gln Pro Ile Ile Leu Thr Ser Glu Leu Gly Lys Ser Tyr Asn Thr
130 135 140

Ala Phe Glu Leu Asn Ile Asn Asp
145 150

<210> 21

<211> 163

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (153)..(160)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (161)..(163)

<223> Cola de poliHis

<400> 21

Met Met Cys Lys Pro Ile Thr Gly Thr Ile Asn Asp Leu Asn Gln Gln
1 5 10 15

Val Trp Thr Leu Gln Gly Gln Asn Leu Val Ala Val Pro Arg Ser Asp
20 25 30

Ser Val Thr Pro Val Thr Val Ala Val Ile Thr Cys Lys Tyr Pro Glu
35 40 45

Ala Leu Glu Gln Gly Arg Gly Asp Pro Ile Tyr Leu Gly Ile Gln Asn
50 55 60

Pro Glu Met Cys Leu Tyr Cys Glu Lys Val Gly Glu Gln Pro Thr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Lys Glu Gln Lys Ile Met Asp Leu Tyr Gly Gln Pro Glu Pro
85 90 95

Val Lys Pro Phe Leu Phe Tyr Arg Ala Lys Thr Gly Arg Thr Ser Thr
100 105 110

Leu Glu Ser Val Ala Phe Pro Asp Trp Phe Ile Ala Ser Ser Lys Arg
115 120 125

Asp Gln Pro Ile Ile Leu Thr Ser Glu Leu Gly Lys Ser Tyr Asn Thr
130 135 140

Ala Phe Glu Leu Asn Ile Asn Asp Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
145 150 155 160

His His His

<210> 22

<211> 172

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (159)..(166)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (167)..(172)

<223> Cola de poliHis

<400> 22

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

Asp Ile Asn His Arg Val Trp Val Leu Gln Asp Gln Thr Leu Ile Ala
20 25 30

Val Pro Arg Lys Asp Arg Met Ser Pro Val Thr Ile Ala Leu Ile Ser
35 40 45

Cys Arg His Val Glu Thr Leu Glu Lys Asp Arg Gly Asn Pro Ile Tyr
50 55 60

Leu Gly Leu Asn Gly Leu Asn Leu Cys Leu Met Cys Ala Lys Val Gly
65 70 75 80

Asp Gln Pro Thr Leu Gln Leu Lys Glu Lys Asp Ile Met Asp Leu Tyr
85 90 95

Asn Gln Pro Glu Pro Val Lys Ser Phe Leu Phe Tyr His Ser Gln Ser
100 105 110

Gly Arg Asn Ser Thr Phe Glu Ser Val Ala Phe Pro Gly Trp Phe Ile
115 120 125

Ala Val Ser Ser Glu Gly Gly Cys Pro Leu Ile Leu Thr Gln Glu Leu
130 135 140

Gly Lys Ala Asn Thr Thr Asp Phe Gly Leu Thr Met Leu Phe Asp Tyr
145 150 155 160

Lys Asp Asp Asp Asp Lys His His His His His His
165 170

<210> 23

<211> 168

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (155)..(162)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (163)..(168)

<223> Cola de poliHis

<400> 23

Met Lys Ile Asp Thr Pro Gln Gln Gly Ser Ile Gln Asp Ile Asn His
1 5 10 15

Arg Val Trp Val Leu Gln Asp Gln Thr Leu Ile Ala Val Pro Arg Lys
20 25 30

Asp Arg Met Ser Pro Val Thr Ile Ala Leu Ile Ser Cys Arg His Val
35 40 45

Glu Thr Leu Glu Lys Asp Arg Gly Asn Pro Ile Tyr Leu Gly Leu Asn
50 55 60

Gly Leu Asn Leu Cys Leu Met Cys Ala Lys Val Gly Asp Gln Pro Thr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Lys Glu Lys Asp Ile Met Asp Leu Tyr Asn Gln Pro Glu
85 90 95

Pro Val Lys Ser Phe Leu Phe Tyr His Ser Gln Ser Gly Arg Asn Ser
100 105 110

Thr Phe Glu Ser Val Ala Phe Pro Gly Trp Phe Ile Ala Val Ser Ser
115 120 125

Glu Gly Gly Cys Pro Leu Ile Leu Thr Gln Glu Leu Gly Lys Ala Asn
130 135 140

Thr Thr Asp Phe Gly Leu Thr Met Leu Phe Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
145 150 155 160

Asp Lys His His His His His His
165

<210> 24

<211> 167

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (154)..(161)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (162)..(167)

<223> Cola de poliHis

<400> 24

Met Ile Asp Thr Pro Gln Gln Gly Ser Ile Gln Asp Ile Asn His Arg
1 5 10 15

Val Trp Val Leu Gln Asp Gln Thr Leu Ile Ala Val Pro Arg Lys Asp
20 25 30

Arg Met Ser Pro Val Thr Ile Ala Leu Ile Ser Cys Arg His Val Glu
35 40 45

Thr Leu Glu Lys Asp Arg Gly Asn Pro Ile Tyr Leu Gly Leu Asn Gly
50 55 60

Leu Asn Leu Cys Leu Met Cys Ala Lys Val Gly Asp Gln Pro Thr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Lys Glu Lys Asp Ile Met Asp Leu Tyr Asn Gln Pro Glu Pro
85 90 95

Val Lys Ser Phe Leu Phe Tyr His Ser Gln Ser Gly Arg Asn Ser Thr
100 105 110

Phe Glu Ser Val Ala Phe Pro Gly Trp Phe Ile Ala Val Ser Ser Glu
115 120 125

Gly Gly Cys Pro Leu Ile Leu Thr Gln Glu Leu Gly Lys Ala Asn Thr
130 135 140

Thr Asp Phe Gly Leu Thr Met Leu Phe Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
145 150 155 160

Lys His His His His His His
165

<210> 25

<211> 166

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (153)..(160)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (161)..(166)

<223> Cola de poliHis

<400> 25

Met Asp Thr Pro Gln Gln Gly Ser Ile Gln Asp Ile Asn His Arg Val
1 5 10 15

Trp Val Leu Gln Asp Gln Thr Leu Ile Ala Val Pro Arg Lys Asp Arg
20 25 30

Met Ser Pro Val Thr Ile Ala Leu Ile Ser Cys Arg His Val Glu Thr
35 40 45

Leu Glu Lys Asp Arg Gly Asn Pro Ile Tyr Leu Gly Leu Asn Gly Leu
50 55 60

Asn Leu Cys Leu Met Cys Ala Lys Val Gly Asp Gln Pro Thr Leu Gln
65 70 75 80

Leu Lys Glu Lys Asp Ile Met Asp Leu Tyr Asn Gln Pro Glu Pro Val
85 90 95

Lys Ser Phe Leu Phe Tyr His Ser Gln Ser Gly Arg Asn Ser Thr Phe
100 105 110

Glu Ser Val Ala Phe Pro Gly Trp Phe Ile Ala Val Ser Ser Glu Gly
115 120 125

Gly Cys Pro Leu Ile Leu Thr Gln Glu Leu Gly Lys Ala Asn Thr Thr
130 135 140

Asp Phe Gly Leu Thr Met Leu Phe Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
145 150 155 160

His His His His His His
165

<210> 26

<211> 153

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 26

Lys Ile Asp Thr Pro Gln Gln Gly Ser Ile Gln Asp Ile Asn His Arg
1 5 10 15

Val Trp Val Leu Gln Asp Gln Thr Leu Ile Ala Val Pro Arg Lys Asp
20 25 30

Arg Met Ser Pro Val Thr Ile Ala Leu Ile Ser Cys Arg His Val Glu
35 40 45

Thr Leu Glu Lys Asp Arg Gly Asn Pro Ile Tyr Leu Gly Leu Asn Gly
50 55 60

Leu Asn Leu Cys Leu Met Cys Ala Lys Val Gly Asp Gln Pro Thr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Lys Glu Lys Asp Ile Met Asp Leu Tyr Asn Gln Pro Glu Pro
85 90 95

Val Lys Ser Phe Leu Phe Tyr His Ser Gln Ser Gly Arg Asn Ser Thr
100 105 110

Phe Glu Ser Val Ala Phe Pro Gly Trp Phe Ile Ala Val Ser Ser Glu
115 120 125

Gly Gly Cys Pro Leu Ile Leu Thr Gln Glu Leu Gly Lys Ala Asn Thr
130 135 140

Thr Asp Phe Gly Leu Thr Met Leu Phe
145 150

<210> 27

<211> 171

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (158)..(165)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (166)..(171)

<223> Cola de poliHis

<400> 27

Met Asn Pro Gln Arg Glu Ala Ala Pro Lys Ser Tyr Ala Ile Arg Asp
1 5 10 15

Ser Arg Gln Met Val Trp Val Leu Ser Gly Asn Ser Leu Ile Ala Ala
20 25 30

Pro Leu Ser Arg Ser Ile Lys Pro Val Thr Leu His Leu Ile Ala Cys
35 40 45

Arg Asp Thr Glu Phe Ser Asp Lys Glu Lys Gly Asn Met Val Tyr Leu
50 55 60

Gly Ile Lys Gly Lys Asp Leu Cys Leu Phe Cys Ala Glu Ile Gln Gly
65 70 75 80

Lys Pro Thr Leu Gln Leu Lys Glu Lys Asn Ile Met Asp Leu Tyr Val
85 90 95

Glu Lys Lys Ala Gln Lys Pro Phe Leu Phe Phe His Asn Lys Glu Gly
100 105 110

Ser Thr Ser Val Phe Gln Ser Val Ser Tyr Pro Gly Trp Phe Ile Ala
115 120 125

Thr Ser Thr Thr Ser Gly Gln Pro Ile Phe Leu Thr Lys Glu Arg Gly
130 135 140

Ile Thr Asn Asn Thr Asn Phe Tyr Leu Asp Ser Val Glu Asp Tyr Lys
145 150 155 160

Asp Asp Asp Asp Lys His His His His His His
165 170

<210> 28

<211> 169

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (156)..(163)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (164)..(169)

<223> Cola de poliHis

<400> 28

Met Gln Arg Glu Ala Ala Pro Lys Ser Tyr Ala Ile Arg Asp Ser Arg
1 5 10 15

Gln Met Val Trp Val Leu Ser Gly Asn Ser Leu Ile Ala Ala Pro Leu
20 25 30

Ser Arg Ser Ile Lys Pro Val Thr Leu His Leu Ile Ala Cys Arg Asp
35 40 45

Thr Glu Phe Ser Asp Lys Glu Lys Gly Asn Met Val Tyr Leu Gly Ile
50 55 60

Lys Gly Lys Asp Leu Cys Leu Phe Cys Ala Glu Ile Gln Gly Lys Pro
65 70 75 80

Thr Leu Gln Leu Lys Glu Lys Asn Ile Met Asp Leu Tyr Val Glu Lys
85 90 95

Lys Ala Gln Lys Pro Phe Leu Phe Phe His Asn Lys Glu Gly Ser Thr
100 105 110

Ser Val Phe Gln Ser Val Ser Tyr Pro Gly Trp Phe Ile Ala Thr Ser
115 120 125

Thr Thr Ser Gly Gln Pro Ile Phe Leu Thr Lys Glu Arg Gly Ile Thr
130 135 140

Asn Asn Thr Asn Phe Tyr Leu Asp Ser Val Glu Asp Tyr Lys Asp Asp
145 150 155 160

Asp Asp Lys His His His His His His
165

<210> 29

<211> 168

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (155)..(162)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (163)..(168)

<223> Cola de poliHis

<400> 29

```
Met Arg Glu Ala Ala Pro Lys Ser Tyr Ala Ile Arg Asp Ser Arg Gln
1               5                   10                  15

Met Val Trp Val Leu Ser Gly Asn Ser Leu Ile Ala Ala Pro Leu Ser
            20                  25                  30

Arg Ser Ile Lys Pro Val Thr Leu His Leu Ile Ala Cys Arg Asp Thr
        35                  40                  45

Glu Phe Ser Asp Lys Glu Lys Gly Asn Met Val Tyr Leu Gly Ile Lys
    50                  55                  60

Gly Lys Asp Leu Cys Leu Phe Cys Ala Glu Ile Gln Gly Lys Pro Thr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Leu Lys Glu Lys Asn Ile Met Asp Leu Tyr Val Glu Lys Lys
                85                  90                  95

Ala Gln Lys Pro Phe Leu Phe Phe His Asn Lys Glu Gly Ser Thr Ser
            100                 105                 110

Val Phe Gln Ser Val Ser Tyr Pro Gly Trp Phe Ile Ala Thr Ser Thr
        115                 120                 125

Thr Ser Gly Gln Pro Ile Phe Leu Thr Lys Glu Arg Gly Ile Thr Asn
    130                 135                 140

Asn Thr Asn Phe Tyr Leu Asp Ser Val Glu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
145                 150                 155                 160

Asp Lys His His His His His His
                165
```

<210> 30

<211> 167

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (154)..(161)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (162)..(167)

<223> Cola de poliHis

<400> 30

```
Met Glu Ala Ala Pro Lys Ser Tyr Ala Ile Arg Asp Ser Arg Gln Met
1               5                   10                  15

Val Trp Val Leu Ser Gly Asn Ser Leu Ile Ala Ala Pro Leu Ser Arg
            20                  25                  30

Ser Ile Lys Pro Val Thr Leu His Leu Ile Ala Cys Arg Asp Thr Glu
        35                  40                  45

Phe Ser Asp Lys Glu Lys Gly Asn Met Val Tyr Leu Gly Ile Lys Gly
    50                  55                  60

Lys Asp Leu Cys Leu Phe Cys Ala Glu Ile Gln Gly Lys Pro Thr Leu
65                  70                  75                  80

Gln Leu Lys Glu Lys Asn Ile Met Asp Leu Tyr Val Glu Lys Lys Ala
                85                  90                  95

Gln Lys Pro Phe Leu Phe Phe His Asn Lys Glu Gly Ser Thr Ser Val
            100                 105                 110

Phe Gln Ser Val Ser Tyr Pro Gly Trp Phe Ile Ala Thr Ser Thr Thr
        115                 120                 125

Ser Gly Gln Pro Ile Phe Leu Thr Lys Glu Arg Gly Ile Thr Asn Asn
    130                 135                 140

Thr Asn Phe Tyr Leu Asp Ser Val Glu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
145                 150                 155                 160

Lys His His His His His His
                165
```

<210> 31

<211> 165

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (152)..(159)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (160)..(165)

<223> Cola de poliHis

<400> 31

```
Ala Ala Pro Lys Ser Tyr Ala Ile Arg Asp Ser Arg Gln Met Val Trp
1               5                   10                  15

Val Leu Ser Gly Asn Ser Leu Ile Ala Ala Pro Leu Ser Arg Ser Ile
            20                  25                  30

Lys Pro Val Thr Leu His Leu Ile Ala Cys Arg Asp Thr Glu Phe Ser
        35                  40                  45

Asp Lys Glu Lys Gly Asn Met Val Tyr Leu Gly Ile Lys Gly Lys Asp
    50                  55                  60

Leu Cys Leu Phe Cys Ala Glu Ile Gln Gly Lys Pro Thr Leu Gln Leu
65                  70                  75                  80

Lys Glu Lys Asn Ile Met Asp Leu Tyr Val Glu Lys Lys Ala Gln Lys
                85                  90                  95

Pro Phe Leu Phe Phe His Asn Lys Glu Gly Ser Thr Ser Val Phe Gln
            100                 105                 110

Ser Val Ser Tyr Pro Gly Trp Phe Ile Ala Thr Ser Thr Thr Ser Gly
        115                 120                 125

Gln Pro Ile Phe Leu Thr Lys Glu Arg Gly Ile Thr Asn Asn Thr Asn
    130                 135                 140
```

Phe Tyr Leu Asp Ser Val Glu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys His
145 150 155 160

His His His His His
165

<210> 32

<211> 153

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 32

Arg Glu Ala Ala Pro Lys Ser Tyr Ala Ile Arg Asp Ser Arg Gln Met
1 5 10 15

Val Trp Val Leu Ser Gly Asn Ser Leu Ile Ala Ala Pro Leu Ser Arg
20 25 30

Ser Ile Lys Pro Val Thr Leu His Leu Ile Ala Cys Arg Asp Thr Glu
35 40 45

Phe Ser Asp Lys Glu Lys Gly Asn Met Val Tyr Leu Gly Ile Lys Gly
50 55 60

Lys Asp Leu Cys Leu Phe Cys Ala Glu Ile Gln Gly Lys Pro Thr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Lys Glu Lys Asn Ile Met Asp Leu Tyr Val Glu Lys Lys Ala
85 90 95

Gln Lys Pro Phe Leu Phe Phe His Asn Lys Glu Gly Ser Thr Ser Val
100 105 110

Phe Gln Ser Val Ser Tyr Pro Gly Trp Phe Ile Ala Thr Ser Thr Thr
115 120 125

Ser Gly Gln Pro Ile Phe Leu Thr Lys Glu Arg Gly Ile Thr Asn Asn
130 135 140

Thr Asn Phe Tyr Leu Asp Ser Val Glu
145 150

<210> 33

<211> 183

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (170)..(177)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (178)..(183)

<223> Cola de poliHis

<400> 33

```
Met Arg Gly Thr Pro Gly Asp Ala Asp Gly Gly Gly Arg Ala Val Tyr
1               5                   10                  15

Gln Ser Met Cys Lys Pro Ile Thr Gly Thr Ile Asn Asp Leu Asn Gln
            20                  25                  30

Gln Val Trp Thr Leu Gln Gly Gln Asn Leu Val Ala Val Pro Arg Ser
        35                  40                  45

Asp Ser Val Thr Pro Val Thr Val Ala Val Ile Thr Cys Lys Tyr Pro
    50                  55                  60

Glu Ala Leu Glu Gln Gly Arg Gly Asp Pro Ile Tyr Leu Gly Ile Gln
65                  70                  75                  80

Asn Pro Glu Met Cys Leu Tyr Cys Glu Lys Val Gly Glu Gln Pro Thr
                85                  90                  95

Leu Gln Leu Lys Glu Gln Lys Ile Met Asp Leu Tyr Gly Gln Pro Glu
            100                 105                 110

Pro Val Lys Pro Phe Leu Phe Tyr Arg Ala Lys Thr Gly Arg Thr Ser
        115                 120                 125

Thr Leu Glu Ser Val Ala Phe Pro Asp Trp Phe Ile Ala Ser Ser Lys
    130                 135                 140

Arg Asp Gln Pro Ile Ile Leu Thr Ser Glu Leu Gly Lys Ser Tyr Asn
145                 150                 155                 160

Thr Ala Phe Glu Leu Asn Ile Asn Asp Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
                165                 170                 175
```

Lys His His His His His His
180

<210> 34

<211> 166

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (153)..(160)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (161)..(166)

<223> Cola de poliHis

<400> 34

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

Val Trp Thr Leu Gln Gly Gln Asn Leu Val Ala Val Pro Arg Ser Asp
20 25 30

Ser Val Thr Pro Val Thr Val Ala Val Ile Thr Cys Lys Tyr Pro Glu
35 40 45

Ala Leu Glu Gln Gly Arg Gly Asp Pro Ile Tyr Leu Gly Ile Gln Asn
50 55 60

Pro Glu Met Cys Leu Tyr Cys Glu Lys Val Gly Glu Gln Pro Thr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Lys Glu Gln Lys Ile Met Asp Leu Tyr Gly Gln Pro Glu Pro
85 90 95

Val Lys Pro Phe Leu Phe Tyr Arg Ala Lys Thr Gly Arg Thr Ser Thr
100 105 110

Leu Glu Ser Val Ala Phe Pro Asp Trp Phe Ile Ala Ser Ser Lys Arg
115 120 125

Asp Gln Pro Ile Ile Leu Thr Ser Glu Leu Gly Lys Ser Tyr Asn Thr
130 135 140

Ala Phe Glu Leu Asn Ile Asn Asp Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
145 150 155 160

His His His His His His
165

<210> 35

<211> 166

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (153)..(160)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (161)..(166)

<223> Cola de poliHis

<400> 35

Met Met Cys Lys Pro Ile Thr Gly Thr Ile Asn Asp Leu Asn Gln Gln
1 5 10 15

Val Trp Thr Leu Gln Gly Gln Asn Leu Val Ala Val Pro Arg Ser Asp
20 25 30

Ser Val Thr Pro Val Thr Val Ala Val Ile Thr Cys Lys Tyr Pro Glu
35 40 45

Ala Leu Glu Gln Gly Arg Gly Asp Pro Ile Tyr Leu Gly Ile Gln Asn
50 55 60

Pro Glu Met Cys Leu Tyr Cys Glu Lys Val Gly Glu Gln Pro Thr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Lys Glu Gln Lys Ile Met Asp Leu Tyr Gly Gln Pro Glu Pro
85 90 95

Val Lys Pro Phe Leu Phe Tyr Arg Ala Lys Thr Gly Arg Thr Ser Thr
100 105 110

Leu Glu Ser Val Ala Phe Pro Asp Trp Phe Ile Ala Ser Ser Lys Arg
115 120 125

Asp Gln Pro Ile Ile Leu Thr Ser Glu Leu Gly Lys Ser Tyr Asn Thr
130 135 140

Ala Phe Glu Leu Asn Ile Asn Asp Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
145 150 155 160

His His His His His His
165

<210> 36

<211> 164

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (151)..(158)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (159)..(164)

<223> Cola de poliHis

<400> 36

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

Thr Leu Gln Gly Gln Asn Leu Val Ala Val Pro Arg Ser Asp Ser Val
20 25 30

Thr Pro Val Thr Val Ala Val Ile Thr Cys Lys Tyr Pro Glu Ala Leu
35 40 45

Glu Gln Gly Arg Gly Asp Pro Ile Tyr Leu Gly Ile Gln Asn Pro Glu
50 55 60

Met Cys Leu Tyr Cys Glu Lys Val Gly Glu Gln Pro Thr Leu Gln Leu
65 70 75 80

Lys Glu Gln Lys Ile Met Asp Leu Tyr Gly Gln Pro Glu Pro Val Lys
85 90 95

Pro Phe Leu Phe Tyr Arg Ala Lys Thr Gly Arg Thr Ser Thr Leu Glu
100 105 110

Ser Val Ala Phe Pro Asp Trp Phe Ile Ala Ser Ser Lys Arg Asp Gln
115 120 125

Pro Ile Ile Leu Thr Ser Glu Leu Gly Lys Ser Tyr Asn Thr Ala Phe
130 135 140

Glu Leu Asn Ile Asn Asp Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys His His
145 150 155 160

His His His His

<210> 37

<211> 152

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 37

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

Val Trp Thr Leu Gln Gly Gln Asn Leu Val Ala Val Pro Arg Ser Asp
20 25 30

Ser Val Thr Pro Val Thr Val Ala Val Ile Thr Cys Lys Tyr Pro Glu
35 40 45

Ala Leu Glu Gln Gly Arg Gly Asp Pro Ile Tyr Leu Gly Ile Gln Asn
50 55 60

Pro Glu Met Cys Leu Tyr Cys Glu Lys Val Gly Glu Gln Pro Thr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Lys Glu Gln Lys Ile Met Asp Leu Tyr Gly Gln Pro Glu Pro
85 90 95

Val Lys Pro Phe Leu Phe Tyr Arg Ala Lys Thr Gly Arg Thr Ser Thr
100 105 110

Leu Glu Ser Val Ala Phe Pro Asp Trp Phe Ile Ala Ser Ser Lys Arg
115 120 125

Asp Gln Pro Ile Ile Leu Thr Ser Glu Leu Gly Lys Ser Tyr Asn Thr
130 135 140

Ala Phe Glu Leu Asn Ile Asn Asp
145 150

<210> 38

<211> 169

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (156)..(163)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (164)..(169)

<223> Cola de poliHis

<400> 38

Met Val Leu Ser Gly Ala Leu Cys Phe Arg Met Lys Asp Ser Ala Leu
1 5 10 15

Lys Val Leu Tyr Leu His Asn Asn Gln Leu Leu Ala Gly Gly Leu His
20 25 30

Ala Gly Lys Val Ile Lys Gly Glu Glu Ile Ser Val Val Pro Asn Arg
35 40 45

Trp Leu Asp Ala Ser Leu Ser Pro Val Ile Leu Gly Val Gln Gly Gly
50 55 60

Ser Gln Cys Leu Ser Cys Gly Val Gly Gln Glu Pro Thr Leu Thr Leu
65 70 75 80

Glu Pro Val Asn Ile Met Glu Leu Tyr Leu Gly Ala Lys Glu Ser Lys
85 90 95

Ser Phe Thr Phe Tyr Arg Arg Asp Met Gly Leu Thr Ser Ser Phe Glu
100 105 110

Ser Ala Ala Tyr Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Val Pro Glu Ala Asp
115 120 125

Gln Pro Val Arg Leu Thr Gln Leu Pro Glu Asn Gly Gly Trp Asn Ala
130 135 140

Pro Ile Thr Asp Phe Tyr Phe Gln Gln Cys Asp Asp Tyr Lys Asp Asp
145 150 155 160

Asp Asp Lys His His His His His His
165

<210> 39

<211> 168

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (155)..(162)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (163)..(168)

<223> Cola de poliHis

<400> 39

```
Val Leu Ser Gly Ala Leu Cys Phe Arg Met Lys Asp Ser Ala Leu Lys
1               5                   10                  15

Val Leu Tyr Leu His Asn Asn Gln Leu Leu Ala Gly Gly Leu His Ala
            20                  25                  30

Gly Lys Val Ile Lys Gly Glu Glu Ile Ser Val Val Pro Asn Arg Trp
        35                  40                  45

Leu Asp Ala Ser Leu Ser Pro Val Ile Leu Gly Val Gln Gly Gly Ser
    50                  55                  60

Gln Cys Leu Ser Cys Gly Val Gly Gln Glu Pro Thr Leu Thr Leu Glu
65                  70                  75                  80

Pro Val Asn Ile Met Glu Leu Tyr Leu Gly Ala Lys Glu Ser Lys Ser
                85                  90                  95

Phe Thr Phe Tyr Arg Arg Asp Met Gly Leu Thr Ser Ser Phe Glu Ser
            100                 105                 110

Ala Ala Tyr Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Val Pro Glu Ala Asp Gln
        115                 120                 125

Pro Val Arg Leu Thr Gln Leu Pro Glu Asn Gly Gly Trp Asn Ala Pro
    130                 135                 140

Ile Thr Asp Phe Tyr Phe Gln Gln Cys Asp Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
145                 150                 155                 160

Asp Lys His His His His His His
                165
```

<210> 40

<211> 168

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (155)..(162)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (163)..(168)

<223> Cola de poliHis

<400> 40

```
Met Leu Ser Gly Ala Leu Cys Phe Arg Met Lys Asp Ser Ala Leu Lys
1               5                   10                  15

Val Leu Tyr Leu His Asn Asn Gln Leu Leu Ala Gly Gly Leu His Ala
            20                  25                  30

Gly Lys Val Ile Lys Gly Glu Glu Ile Ser Val Val Pro Asn Arg Trp
        35                  40                  45

Leu Asp Ala Ser Leu Ser Pro Val Ile Leu Gly Val Gln Gly Gly Ser
    50                  55                  60

Gln Cys Leu Ser Cys Gly Val Gly Gln Glu Pro Thr Leu Thr Leu Glu
65                  70                  75                  80

Pro Val Asn Ile Met Glu Leu Tyr Leu Gly Ala Lys Glu Ser Lys Ser
                85                  90                  95

Phe Thr Phe Tyr Arg Arg Asp Met Gly Leu Thr Ser Ser Phe Glu Ser
            100                 105                 110

Ala Ala Tyr Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Val Pro Glu Ala Asp Gln
        115                 120                 125

Pro Val Arg Leu Thr Gln Leu Pro Glu Asn Gly Gly Trp Asn Ala Pro
    130                 135                 140

Ile Thr Asp Phe Tyr Phe Gln Gln Cys Asp Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
145                 150                 155                 160

Asp Lys His His His His His His
                165
```

<210> 41

<211> 166

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (153)..(160)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (161)..(166)

<223> Cola de poliHis

<400> 41

```
Ser Gly Ala Leu Cys Phe Arg Met Lys Asp Ser Ala Leu Lys Val Leu
1               5                   10                  15

Tyr Leu His Asn Asn Gln Leu Leu Ala Gly Gly Leu His Ala Gly Lys
            20                  25                  30

Val Ile Lys Gly Glu Glu Ile Ser Val Val Pro Asn Arg Trp Leu Asp
        35                  40                  45

Ala Ser Leu Ser Pro Val Ile Leu Gly Val Gln Gly Gly Ser Gln Cys
    50                  55                  60

Leu Ser Cys Gly Val Gly Gln Glu Pro Thr Leu Thr Leu Glu Pro Val
65                  70                  75                  80

Asn Ile Met Glu Leu Tyr Leu Gly Ala Lys Glu Ser Lys Ser Phe Thr
                85                  90                  95

Phe Tyr Arg Arg Asp Met Gly Leu Thr Ser Ser Phe Glu Ser Ala Ala
            100                 105                 110

Tyr Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Val Pro Glu Ala Asp Gln Pro Val
        115                 120                 125

Arg Leu Thr Gln Leu Pro Glu Asn Gly Gly Trp Asn Ala Pro Ile Thr
    130                 135                 140

Asp Phe Tyr Phe Gln Gln Cys Asp Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
145                 150                 155                 160

His His His His His His
                165
```

<210> 42

<211> 165

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (152)..(159)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (160)..(165)

<223> Cola de poliHis

<400> 42

```
Gly Ala Leu Cys Phe Arg Met Lys Asp Ser Ala Leu Lys Val Leu Tyr
1               5                   10                  15

Leu His Asn Asn Gln Leu Leu Ala Gly Gly Leu His Ala Gly Lys Val
            20                  25                  30

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

Ser Leu Ser Pro Val Ile Leu Gly Val Gln Gly Gly Ser Gln Cys Leu
    50                  55                  60

Ser Cys Gly Val Gly Gln Glu Pro Thr Leu Thr Leu Glu Pro Val Asn
65                  70                  75                  80

Ile Met Glu Leu Tyr Leu Gly Ala Lys Glu Ser Lys Ser Phe Thr Phe
                85                  90                  95

Tyr Arg Arg Asp Met Gly Leu Thr Ser Ser Phe Glu Ser Ala Ala Tyr
            100                 105                 110

Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Val Pro Glu Ala Asp Gln Pro Val Arg
        115                 120                 125

Leu Thr Gln Leu Pro Glu Asn Gly Gly Trp Asn Ala Pro Ile Thr Asp
    130                 135                 140
```

Phe Tyr Phe Gln Gln Cys Asp Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys His
145 150 155 160

His His His His His
165

<210> 43

<211> 154

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 43

Val Leu Ser Gly Ala Leu Cys Phe Arg Met Lys Asp Ser Ala Leu Lys
1 5 10 15

Val Leu Tyr Leu His Asn Asn Gln Leu Leu Ala Gly Gly Leu His Ala
20 25 30

Gly Lys Val Ile Lys Gly Glu Glu Ile Ser Val Val Pro Asn Arg Trp
35 40 45

Leu Asp Ala Ser Leu Ser Pro Val Ile Leu Gly Val Gln Gly Gly Ser
50 55 60

Gln Cys Leu Ser Cys Gly Val Gly Gln Glu Pro Thr Leu Thr Leu Glu
65 70 75 80

Pro Val Asn Ile Met Glu Leu Tyr Leu Gly Ala Lys Glu Ser Lys Ser
85 90 95

Phe Thr Phe Tyr Arg Arg Asp Met Gly Leu Thr Ser Ser Phe Glu Ser
100 105 110

Ala Ala Tyr Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Val Pro Glu Ala Asp Gln
115 120 125

Pro Val Arg Leu Thr Gln Leu Pro Glu Asn Gly Gly Trp Asn Ala Pro
130 135 140

Ile Thr Asp Phe Tyr Phe Gln Gln Cys Asp
145 150

<210> 44

<211> 24

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 44

```
Met Val Leu Ser Gly Ala Leu Cys Phe Arg Met Lys Asp Ser Ala Leu
1               5                   10                  15

Lys Val Leu Tyr Leu His Asn Asn
            20
```

<210> 45

<211> 23

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 45

```
Val Leu Ser Gly Ala Leu Cys Phe Arg Met Lys Asp Ser Ala Leu Lys
1               5                   10                  15

Val Leu Tyr Leu His Asn Asn
            20
```

<210> 46

<211> 23

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 46

```
Met Leu Ser Gly Ala Leu Cys Phe Arg Met Lys Asp Ser Ala Leu Lys
1               5                   10                  15

Val Leu Tyr Leu His Asn Asn
            20
```

<210> 47

<211> 21

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 47

Ser Gly Ala Leu Cys Phe Arg Met Lys Asp Ser Ala Leu Lys Val Leu
1 5 10 15

Tyr Leu His Asn Asn
20

<210> 48

<211> 20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 48

Gly Ala Leu Cys Phe Arg Met Lys Asp Ser Ala Leu Lys Val Leu Tyr
1 5 10 15

Leu His Asn Asn
20

<210> 49

<211> 24

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 49

Met Lys Ile Asp Thr Pro Gln Arg Gly Ser Ile Gln Asp Ile Asn His
1 5 10 15

Arg Val Trp Val Leu Gln Asp Gln
20

<210> 50

<211> 23

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 50

Met Ile Asp Thr Pro Gln Arg Gly Ser Ile Gln Asp Ile Asn His Arg
1 5 10 15

Val Trp Val Leu Gln Asp Gln
20

<210> 51

<211> 22

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 51

```
Met Asp Thr Pro Gln Arg Gly Ser Ile Gln Asp Ile Asn His Arg Val
1               5                   10                  15

Trp Val Leu Gln Asp Gln
            20
```

<210> 52

<211> 25

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 52

```
Met Gln Arg Glu Ala Ala Pro Lys Ser Tyr Ala Ile Arg Asp Ser Arg
1               5                   10                  15

Gln Met Val Trp Val Leu Ser Gly Asn
            20                  25
```

<210> 53

<211> 24

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 53

```
Met Arg Glu Ala Ala Pro Lys Ser Tyr Ala Ile Arg Asp Ser Arg Gln
1               5                   10                  15

Met Val Trp Val Leu Ser Gly Asn
            20
```

<210> 54

<211> 23

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 54

Met Glu Ala Ala Pro Lys Ser Tyr Ala Ile Arg Asp Ser Arg Gln Met
1 5 10 15

Val Trp Val Leu Ser Gly Asn
20

<210> 55

<211> 21

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 55

Ala Ala Pro Lys Ser Tyr Ala Ile Arg Asp Ser Arg Gln Met Val Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gly Asn
20

<210> 56

<211> 23

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 56

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

Val Trp Thr Leu Gln Gly Gln
20

<210> 57

<211> 23

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 57

Met Met Cys Lys Pro Ile Thr Gly Thr Ile Asn Asp Leu Asn Gln Gln
1 5 10 15

Val Trp Thr Leu Gln Gly Gln
20

<210> 58

<211> 21

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 58

```
Cys Lys Pro Ile Thr Gly Thr Ile Asn Asp Leu Asn Gln Gln Val Trp
1               5                   10                  15

Thr Leu Gln Gly Gln
            20
```

<210> 59

<211> 28

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 59

```
Met Glu Lys Ala Leu Lys Ile Asp Thr Pro Gln Gln Gly Ser Ile Gln
1               5                   10                  15

Asp Ile Asn His Arg Val Trp Val Leu Gln Asp Gln
            20                  25
```

<210> 60

<211> 23

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 60

```
Lys Ile Asp Thr Pro Gln Gln Gly Ser Ile Gln Asp Ile Asn His Arg
 1               5                   10                  15

 Val Trp Val Leu Gln Asp Gln
            20
```

<210> 61

<211> 27

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 61

Met Asn Pro Gln Arg Glu Ala Ala Pro Lys Ser Tyr Ala Ile Arg Asp
1 5 10 15

Ser Arg Gln Met Val Trp Val Leu Ser Gly Asn
20 25

<210> 62

<211> 23

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 62

Arg Glu Ala Ala Pro Lys Ser Tyr Ala Ile Arg Asp Ser Arg Gln Met
1 5 10 15

Val Trp Val Leu Ser Gly Asn
20

<210> 63

<211> 40

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 63

Met Arg Gly Thr Pro Gly Asp Ala Asp Gly Gly Gly Arg Ala Val Tyr
1 5 10 15

Gln Ser Met Cys Lys Pro Ile Thr Gly Thr Ile Asn Asp Leu Asn Gln
20 25 30

Gln Val Trp Thr Leu Gln Gly Gln
35 40

<210> 64

<400> 64

000

<210> 65

<211> 153

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 65

```
Lys Ile Asp Thr Pro Gln Arg Gly Ser Ile Gln Asp Ile Asn His Arg
1               5                   10                  15

Val Trp Val Leu Gln Asp Gln Thr Leu Ile Ala Val Pro Arg Lys Asp
            20                  25                  30

Arg Met Ser Pro Val Thr Ile Ala Leu Ile Ser Cys Arg His Val Glu
        35                  40                  45

Thr Leu Glu Lys Asp Arg Gly Asn Pro Ile Tyr Leu Gly Leu Asn Gly
    50                  55                  60

Leu Asn Leu Cys Leu Met Cys Ala Lys Val Gly Asp Gln Pro Thr Leu
65                  70                  75                  80

Gln Leu Lys Glu Lys Asp Ile Met Asp Leu Tyr Asn Gln Pro Glu Pro
                85                  90                  95

Val Lys Ser Phe Leu Phe Tyr His Ser Gln Ser Gly Arg Asn Ser Thr
            100                 105                 110

Phe Glu Ser Val Ala Phe Pro Gly Trp Phe Ile Ala Val Ser Ser Glu
        115                 120                 125

Gly Gly Cys Pro Leu Ile Leu Thr Gln Glu Leu Gly Lys Ala Asn Thr
    130                 135                 140

Thr Asp Phe Gly Leu Thr Met Leu Phe
145                 150
```

<210> 66

<211> 164

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (154)..(161)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (162)..(164)

<223> Cola de poliHis

<400> 66

Lys Ile Asp Thr Pro Gln Arg Gly Ser Ile Gln Asp Ile Asn His Arg
1 5 10 15

Val Trp Val Leu Gln Asp Gln Thr Leu Ile Ala Val Pro Arg Lys Asp
20 25 30

Arg Met Ser Pro Val Thr Ile Ala Leu Ile Ser Cys Arg His Val Glu
35 40 45

Thr Leu Glu Lys Asp Arg Gly Asn Pro Ile Tyr Leu Gly Leu Asn Gly
50 55 60

Leu Asn Leu Cys Leu Met Cys Ala Lys Val Gly Asp Gln Pro Thr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Lys Glu Lys Asp Ile Met Asp Leu Tyr Asn Gln Pro Glu Pro
85 90 95

Val Lys Ser Phe Leu Phe Tyr His Ser Gln Ser Gly Arg Asn Ser Thr
100 105 110

Phe Glu Ser Val Ala Phe Pro Gly Trp Phe Ile Ala Val Ser Ser Glu
115 120 125

Gly Gly Cys Pro Leu Ile Leu Thr Gln Glu Leu Gly Lys Ala Asn Thr
130 135 140

Thr Asp Phe Gly Leu Thr Met Leu Phe Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
145 150 155 160

Lys His His His

<210> 67

<211> 153

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 67

Met Ile Asp Thr Pro Gln Arg Gly Ser Ile Gln Asp Ile Asn His Arg
1 5 10 15

Val Trp Val Leu Gln Asp Gln Thr Leu Ile Ala Val Pro Arg Lys Asp
20 25 30

Arg Met Ser Pro Val Thr Ile Ala Leu Ile Ser Cys Arg His Val Glu
35 40 45

Thr Leu Glu Lys Asp Arg Gly Asn Pro Ile Tyr Leu Gly Leu Asn Gly
50 55 60

Leu Asn Leu Cys Leu Met Cys Ala Lys Val Gly Asp Gln Pro Thr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Lys Glu Lys Asp Ile Met Asp Leu Tyr Asn Gln Pro Glu Pro
85 90 95

Val Lys Ser Phe Leu Phe Tyr His Ser Gln Ser Gly Arg Asn Ser Thr
100 105 110

Phe Glu Ser Val Ala Phe Pro Gly Trp Phe Ile Ala Val Ser Ser Glu
115 120 125

Gly Gly Cys Pro Leu Ile Leu Thr Gln Glu Leu Gly Lys Ala Asn Thr
130 135 140

Thr Asp Phe Gly Leu Thr Met Leu Phe
145 150

<210> 68

<211> 164

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (154)..(161)

<223> Cola de péptido FLAG

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (162)..(164)

<223> Cola de poliHis

<400> 68

Met Ile Asp Thr Pro Gln Arg Gly Ser Ile Gln Asp Ile Asn His Arg
1 5 10 15

Val Trp Val Leu Gln Asp Gln Thr Leu Ile Ala Val Pro Arg Lys Asp
20 25 30

Arg Met Ser Pro Val Thr Ile Ala Leu Ile Ser Cys Arg His Val Glu
35 40 45

Thr Leu Glu Lys Asp Arg Gly Asn Pro Ile Tyr Leu Gly Leu Asn Gly
50 55 60

Leu Asn Leu Cys Leu Met Cys Ala Lys Val Gly Asp Gln Pro Thr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Lys Glu Lys Asp Ile Met Asp Leu Tyr Asn Gln Pro Glu Pro
85 90 95

Val Lys Ser Phe Leu Phe Tyr His Ser Gln Ser Gly Arg Asn Ser Thr
100 105 110

Phe Glu Ser Val Ala Phe Pro Gly Trp Phe Ile Ala Val Ser Ser Glu
115 120 125

Gly Gly Cys Pro Leu Ile Leu Thr Gln Glu Leu Gly Lys Ala Asn Thr
130 135 140

Thr Asp Phe Gly Leu Thr Met Leu Phe Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
145 150 155 160

Lys His His His

<210> 69

<211> 465

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 69

gtcctgagtg gggcgctgtg cttccgaatg aaggactcgg cattgaaggt gctttatctg 60

cataataacc agcttctagc tggagggctg catgcaggga aggtcattaa aggtgaagag 120

atcagcgtgg tccccaatcg gtggctggat gccagcctgt cccccgtcat cctgggtgtc 180

cagggtggaa gccagtgcct gtcatgtggg gtggggcagg agccgactct aacactagag 240

ccagtgaaca tcatggagct ctatcttggt gccaaggaat ccaagagctt caccttctac 300

cggcgggaca tggggctcac ctccagcttc gagtcggctg cctacccggg ctggttcctg 360
tgcacggtgc ctgaagccga tcagcctgtc agactcaccc agcttcccga gaatggtggc 420
tggaatgccc ccatcacaga cttctacttc cagcagtgtg actaa 465

<210> 70
<211> 531
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 70
atgctgagtg gggcgctgtg cttccgaatg aaggactcgg cattgaaggt gctttatctg 60
cataataacc agcttctagc tggagggctg catgcaggga aggtcattaa aggtgaagag 120
atcagcgtgg tccccaatcg gtggctggat gccagcctgt cccccgtcat cctgggtgtc 180
cagggtggaa gccagtgcct gtcatgtggg gtggggcagg agccgactct aacactagag 240
ccagtgaaca tcatggagct ctatcttggt gccaaggaat ccaagagctt caccttctac 300
cggcgggaca tggggctcac ctccagcttc gagtcggctg cctacccggg ctggttcctg 360
tgcacggtgc ctgaagccga tcagcctgtc agactcaccc agcttcccga gaatggtggc 420
tggaatgccc ccatcacaga cttctacttc cagcagtgtg acagatctgg cagttctgac 480
tacaaggacg acgacgacaa gggcagttct caccatcacc atcaccacta g 531

<210> 71
<211> 462
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 71
aaaattgaca cacctcagcg ggggagcatt caggatatca atcatcgggt gtgggttctt 60
caggaccaga cgctcatagc agtcccgagg aaggaccgta tgtctccagt cactattgcc 120
ttaatctcat gccgacatgt ggagaccctt gagaaagaca gagggaaccc catctacctg 180
ggcctgaatg gactcaatct ctgcctgatg tgtgctaaag tcggggacca gcccacactg 240
cagctgaagg aaaaggatat aatggatttg tacaaccaac ccgagcctgt gaagtccttt 300
ctcttctacc acagccagag tggcaggaac tccaccttcg agtctgtggc tttccctggc 360
tggttcatcg ctgtcagctc tgaaggaggc tgtcctctca tccttaccca agaactgggg 420
aaagccaaca ctactgactt tgggttaact atgctgtttt aa 462

<210> 72

<211> 528

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 72

atgattgaca cacctcagcg ggggagcatt caggatatca atcatcgggt gtgggttctt 60

caggaccaga cgctcatagc agtcccgagg aaggaccgta tgtctccagt cactattgcc 120

ttaatctcat gccgacatgt ggagaccctt gagaaagaca gagggaaccc catctacctg 180

ggcctgaatg gactcaatct ctgcctgatg tgtgctaaag tcggggacca gcccacactg 240

cagctgaagg aaaaggatat aatggatttg tacaaccaac ccgagcctgt gaagtccttt 300

ctcttctacc acagccagag tggcaggaac tccaccttcg agtctgtggc tttccctggc 360

tggttcatcg ctgtcagctc tgaaggaggc tgtcctctca tccttaccca agaactgggg 420

aaagccaaca ctactgactt tgggttaact atgctgttta gatctggcag ttctgactac 480

aaggacgacg acgacaaggg cagttctcac catcaccatc accactag 528

<210> 73

<211> 462

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 73

cgcgaggcag cacccaaatc ctatgctatt cgtgattctc gacagatggt gtgggtcctg 60

agtggaaatt ctttaatagc agctcctctt agccgcagca ttaagcctgt cactcttcat 120

ttaatagcct gtagagacac agaattcagt gacaaggaaa agggtaatat ggtttacctg 180

ggaatcaagg gaaaagatct ctgtctcttc tgtgcagaaa ttcagggcaa gcctactttg 240

cagcttaagg aaaaaaatat catggacctg tatgtggaga agaaagcaca gaagcccttt 300

ctctttttcc acaataaaga aggctccact tctgtctttc agtcagtctc ttaccctggc 360

tggttcatag ccacctccac cacatcagga cagcccatct ttctcaccaa ggagagaggc 420

ataactaata acactaactt ctacttagat tctgtggaat aa 462

<210> 74

<211> 528

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 74

atggaggcag cacccaaatc ctatgctatt cgtgattctc gacagatggt gtgggtcctg 60
agtggaaatt ctttaatagc agctcctctt agccgcagca ttaagcctgt cactcttcat 120
ttaatagcct gtagagacac agaattcagt gacaaggaaa agggtaatat ggtttacctg 180
ggaatcaagg gaaaagatct ctgtctcttc tgtgcagaaa ttcagggcaa gcctactttg 240
cagcttaagg aaaaaaatat catggacctg tatgtggaga agaaagcaca gaagcccttt 300
ctctttttcc acaataaaga aggctccact tctgtctttc agtcagtctc ttaccctggc 360
tggttcatag ccacctccac cacatcagga cagcccatct ttctcaccaa ggagagaggc 420
ataactaata acactaactt ctacttagat tctgtggaag gatctggcag ttctgactac 480
aaggacgacg acgacaaggg cagttctcac catcaccatc accactag 528

<210> 75
<211> 459
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 75
tcaatgtgta aacctattac tgggactatt aatgatttga atcagcaagt gtggaccctt 60
cagggtcaga accttgtggc agttccacga agtgacagtg tgaccccagt cactgttgct 120
gttatcacat gcaagtatcc agaggctctt gagcaaggca gaggggatcc catttatttg 180
ggaatccaga atccagaaat gtgtttgtat tgtgagaagg ttggagaaca gcccacattg 240
cagctaaaag agcagaagat catggatctg tatggccaac ccgagcccgt gaaacccttc 300
cttttctacc gtgccaagac tggtaggacc tccacccttg agtctgtggc cttcccggac 360
tggttcattg cctcctccaa gagagaccag cccatcattc tgacttcaga acttgggaag 420
tcatacaaca ctgcctttga attaaatata aatgactaa 459

<210> 76
<211> 528
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 76

atgtcaatgt gtaaacctat tactgggact attaatgatt tgaatcagca agtgtggacc 60
cttcagggtc agaaccttgt ggcagttcca cgaagtgaca gtgtgacccc agtcactgtt 120
gctgttatca catgcaagta tccagaggct cttgagcaag gcagagggga tcccatttat 180
ttgggaatcc agaatccaga aatgtgtttg tattgtgaga aggttggaga acagcccaca 240
ttgcagctaa aagagcagaa gatcatggat ctgtatggcc aacccgagcc cgtgaaaccc 300
ttccttttct accgtgccaa gactggtagg acctccaccc ttgagtctgt ggccttcccg 360
gactggttca ttgcctcctc caagagagac cagcccatca ttctgacttc agaacttggg 420
aagtcataca acactgcctt tgaattaaat ataaatgaca gatctggcag ttctgactac 480
aaggacgacg acgacaaggg cagttctcac catcaccatc accactag 528

<210> 77
<211> 525
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 77
atgatgtgta aacctattac tgggactatt aatgatttga atcagcaagt gtggaccctt 60
cagggtcaga accttgtggc agttccacga agtgacagtg tgaccccagt cactgttgct 120
gttatcacat gcaagtatcc agaggctctt gagcaaggca gaggggatcc catttatttg 180
ggaatccaga atccagaaat gtgtttgtat tgtgagaagg ttggagaaca gcccacattg 240
cagctaaaag agcagaagat catggatctg tatggccaac ccgagcccgt gaaacccttc 300
cttttctacc gtgccaagac tggtaggacc tccacccttg agtctgtggc cttcccggac 360
tggttcattg cctcctccaa gagagaccag cccatcattc tgacttcaga acttgggaag 420
tcatacaaca ctgcctttga attaaatata aatgacagat ctggcagttc tgactacaag 480
gacgacgacg acaagggcag ttctcaccat caccatcacc actag 525

<210> 78
<211> 819
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(357)
<223> Cola de SUMO

<400> 78

atgggcagca gccatcatca tcatcatcac ggcagcggcc tggtgccgcg cggcagcgct 60
agcatgtcgg actcagaagt caatcaagaa gctaagccag aggtcaagcc agaagtcaag 120
cctgagactc acatcaattt aaaggtgtcc gatggatctt cagagatctt cttcaagatc 180
aaaaagacca ctcctttaag aaggctgatg gaagcgttcg ctaaaagaca gggtaaggaa 240
atggactcct taagattctt gtacgacggt attagaattc aagctgatca gacccctgaa 300
gatttggaca tggaggataa cgatattatt gaggctcaca gagaacagat tggtggtaaa 360
attgacacac ctcagcgggg gagcattcag gatatcaatc atcgggtgtg ggttcttcag 420
gaccagacgc tcatagcagt cccgaggaag gaccgtatgt ctccagtcac tattgcctta 480
atctcatgcc gacatgtgga gacccttgag aaagacagag ggaaccccat ctacctgggc 540
ctgaatggac tcaatctctg cctgatgtgt gctaaagtcg gggaccagcc cacactgcag 600
ctgaaggaaa aggatataat ggatttgtac aaccaacccg agcctgtgaa gtcctttctc 660
ttctaccaca gccagagtgg caggaactcc accttcgagt ctgtggcttt ccctggctgg 720
ttcatcgctg tcagctctga aggaggctgt cctctcatcc ttacccaaga actggggaaa 780
gccaacacta ctgactttgg gttaactatg ctgttttaa 819

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido de IL-1F5 aislado que es un antagonista de la activación/transducción de señales a través de IL-1Rrp2, comprendiendo el polipéptido de IL-1F5 una secuencia de aminoácidos que tiene una metionina en la posición diez de la secuencia de aminoácidos, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno de la secuencia de aminoácidos, en el que la secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 9.

2. Polipéptido de IL-1F5 aislado según la reivindicación 1, en el que el aminoácido N-terminal en la posición uno es una valina o una metionina.

3. Polipéptido de IL-1F5 aislado según la reivindicación 1, en el que el aminoácido en la posición dos con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno, es una leucina.

4. Polipéptido de IL-1F5 aislado según la reivindicación 1, en el que el polipéptido de IL-1F5 aislado es más antagonista de la activación/transducción de señales a través de IL-1Rrp2 que un polipéptido de IL-1F5 que consiste en SEQ ID NO 1.

5. Uso del polipéptido de IL-1F5 según la reivindicación 1 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un estado inflamatorio o autoinmunitario en un sujeto, en el que el estado inflamatorio o autoinmunitario está mediado por IL-1Rrp2.

6. Uso según la reivindicación 5, en el que el estado que va a tratarse es un estado inflamatorio de la piel, los pulmones o las vías respiratorias mediado por IL-1Rrp2.

7. Uso según la reivindicación 5, en el que el estado que va a tratarse se selecciona del grupo que consiste en psoriasis, dermatitis seborreica, dermatitis atópica, incluyendo dermatitis atópica crónica, dermatitis de contacto alérgica, liquen simple crónico, pitiriasis rubra pilaris, dermatitis numular, asma, rinitis alérgica, enfermedad por reflujo gastroesofágico, estados artríticos incluyendo artritis reumatoide, artritis psoriásica y osteoartritis.

8. Uso según la reivindicación 5, en el que el sujeto es humano.

9. Polipéptido de IL-1F5 según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un estado inflamatorio o autoinmunitario en un sujeto, en el que el estado inflamatorio o autoinmunitario está mediado por IL-1Rrp2.

10. Polipéptido como se indica en la reivindicación 9, en el que el estado que va a tratarse es un estado inflamatorio de la piel, los pulmones o las vías respiratorias mediado por IL-1Rrp2.

11. Polipéptido como se indica en la reivindicación 9, en el que el estado que va a tratarse se selecciona del grupo que consiste en psoriasis, dermatitis seborreica, dermatitis atópica, incluyendo dermatitis atópica crónica, dermatitis de contacto alérgica, liquen simple crónico, pitiriasis rubra pilaris, dermatitis numular, asma, rinitis alérgica, enfermedad por reflujo gastroesofágico, estados artríticos incluyendo, artritis reumatoide, artritis psoriásica y osteoartritis.

12. Polipéptido como se indica en la reivindicación 9, en el que el sujeto es humano.

13. Polipéptido de IL-1F6 aislado que es un agonista de la activación/transducción de señales a través de IL-1Rrp2, en donde el polipéptido de IL-1F6 comprende (i) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 2; y (ii) la secuencia isoleucina-glutamina-ácido aspártico (Ile-Glu-Asp) que coincide con la secuencia consenso @XD, en la que la isoleucina de la secuencia Ile-Glu-Asp está ubicada en la posición diez de la secuencia de aminoácidos, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno de la secuencia de aminoácidos.

14. Polipéptido de IL-1F6 aislado según la reivindicación 13, en el que el aminoácido N-terminal en la posición uno es una lisina o una metionina.

15. Polipéptido de IL-1F6 aislado según la reivindicación 13, en el que el aminoácido en la posición dos con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno, es una isoleucina.

16. Polipéptido de IL-1F6 aislado según la reivindicación 13, en el que el polipéptido de IL-1F6 aislado es más agonista de la activación/transducción de señales a través de IL-1Rrp2 que un polipéptido de IL-1F6 que consiste en SEQ ID NO 2.

17. Polipéptido de IL-1F6 aislado según la reivindicación 13, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 65, SEQ ID NO 66, SEQ ID NO 67 y SEQ ID NO 68.

18. Polipéptido de IL-1F8 aislado que es un agonista de la activación/transducción de señales a través de IL-1Rrp2, comprendiendo el polipéptido de IL-1F8 (i) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 3; y (ii) la secuencia isoleucina-arginina-ácido aspártico (Ile-Arg-Asp) que coincide con la secuencia consenso @XD, en la que la isoleucina de la secuencia Ile-Arg-Asp está ubicada en la posición diez de la secuencia de aminoácidos, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno de la secuencia de aminoácidos.

19. Polipéptido de IL-1F8 aislado según la reivindicación 18, en el que el aminoácido N-terminal en la posición uno es una arginina o una metionina.

20. Polipéptido de IL-1F8 aislado según la reivindicación 18, en el que el aminoácido en la posición dos, siendo la posición dos con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno, es un ácido glutámico.

21. Polipéptido de IL-1F8 aislado según la reivindicación 18, en el que el polipéptido de IL-1F8 aislado es más agonista de la activación/transducción de señales a través de IL-1Rrp2 que un polipéptido de IL-1F8 que consiste en SEQ ID NO 3.

22. Polipéptido de IL-1F8 aislado según la reivindicación 18, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 16 y SEQ ID NO 17.

23. Polipéptido de IL-1F9 aislado que es un agonista de la activación/transducción de señales a través de IL-1Rrp2, comprendiendo el polipéptido de IL-1F9 (i) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 85% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 4; y (ii) la secuencia isoleucina-asparagina-ácido aspártico (Ile-Asn-Asp) que coincide con la secuencia consenso @XD, en la que la isoleucina de la secuencia Ile-Asn-Asp está ubicada en la posición diez de la secuencia de aminoácidos, siendo la posición diez con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno de la secuencia de aminoácidos.

24. Polipéptido de IL-1F9 aislado según la reivindicación 23, en el que el aminoácido N-terminal en la posición uno es una serina o una metionina.

25. Polipéptido de IL-1F9 aislado según la reivindicación 23, en el que el aminoácido en la posición dos con relación al aminoácido N-terminal en la posición uno, es una metionina.

26. Polipéptido de IL-1F9 aislado según la reivindicación 23, en el que el polipéptido de IL-1F9 aislado es más agonista de la activación/transducción de señales a través de IL-1Rrp2 que un polipéptido de IL-1F9 que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO 4.

27. Polipéptido de IL-1F9 aislado según la reivindicación 23, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 18, SEQ ID NO 19, SEQ ID NO 20 y SEQ ID NO 21.

28. Secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1, 13, 18 ó 23.

29. Vector recombinante que dirige la expresión del ácido nucleico según la reivindicación 28.

30. Célula huésped transfectada o transducida con el vector según la reivindicación 29.

31. Método de producción de un polipéptido de IL-1F5, IL-1F6, IL-1F8 o IL-1F9, que comprende cultivar la célula huésped según la reivindicación 30 en condiciones que promueven la expresión y aislar el polipéptido de IL-1F5, IL-1F6, IL-1F8 o IL-1F9 expresado, respectivamente.

32. Composición que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1, 13, 18 ó 23 y un diluyente, excipiente o portador fisiológicamente aceptable.

33. Uso del polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 13, 18 ó 23, para la preparación de una composición farmacéutica para estimular el sistema inmunitario de un paciente inmunosuprimido.

34. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 13, 18 ó 23, para su uso en la estimulación del sistema inmunitario de un paciente inmunosuprimido.

Consenso	@XD
IL-1F5	~~~~~~~~~~~~~~~~~MVLSGALCFRMKDSALKVLYLHNN
IL-1F6	~~~~~~~~~~~~MEKALKIDTPQRGSIQDINHRVWVLQDQ
IL-1F8	~~~~~~~~~~~~~MNPQREAAPKSYAIRDSRQMVWVLSGN
IL-1F9	MRGTPGDADGGGRAVYQSMCKPITGTINDLNQQVWTLQGQ

FIGURA 1

HuIL-1F5:

MVLSGALCFRMKDSALKVLYLHNNQLLAGGLHAGKVIKGEEISVVPNRWL
DASLSPVILGVQGGSQCLSCGVGQEPTLTLEPVNIMELYLGAKESKSFTF
YRRDMGLTSSFESAAYPGWFLCTVPEADQPVRLTQLPENGGWNAPITDFY
FQQCD (SEQ ID NO 1)

HuIL-1F6:

MEKALKIDTPQQGSIQDINHRVWVLQDQTLIAVPRKDRMSPVTIALISCR
HVETLEKDRGNPIYLGLNGLNLCLMCAKVGDQPTLQLKEKDIMDLYNQPE
PVKSFLFYHSQSGRNSTFESVAFPGWFIAVSSEGGCPLILTQELGKANTT
DFGLTMLF (SEQ ID NO 2)

HuIL-1F8:

MNPQREAAPKSYAIRDSRQMVWVLSGNSLIAAPLSRSIKPVTLHLIACRD
TEFSDKEKGNMVYLGIKGKDLCLFCAEIQGKPTLQLKEKNIMDLYVEKKA
QKPFLFFHNKEGSTSVFQSVSYPGWFIATSTTSGQPIFLTKERGITNNTN
FYLDSVE (SEQ ID NO 3)

HuIL-1F9:

MRGTPGDADGGGRAVYQSMCKPITGTINDLNQQVWTLQGQNLVAVPRS
DSVTPVTVAVITCKYPEALEQGRGDPIYLGIQNPEMCLYCEKVGEQPTLQ
LKEQKIMDLYGQPEPVKPFLFYRAKTGRTSTLESVAFPDWFIASSKRDQPII
LTSELGKSYNTAFELNIND (SEQ ID NO 4)

FIGURA 2