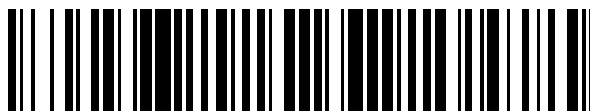


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 578**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2003 E 10003365 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013 EP 2213685**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal anti-IL-1R1 humano terapéutico**

30 Prioridad:

06.09.2002 US 408719

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

20.03.2014

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (50.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US y
MEDAREX, L.L.C. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HUANG, HAICHUN;
VARNUM, BRIAN;
VEZINA, CHRIS;
WITTE, ALISON;
QIAN, XUEMING;
MARTIN, FRANCIS y
ELLIOTT, GARY**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 449 578 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

Anticuerpo monoclonal anti-IL-1R1 humano terapéutico

- 5 Esta solicitud está relacionada y reivindica prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. número de serie 60/408.719 presentada el 6 de septiembre de 2002.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 10 La invención se refiere a anticuerpos que se unen a la proteína receptor de interleucina 1 de tipo 1 (IL-1R1). También se proporcionan composiciones, particularmente composiciones farmacéuticas y métodos para tratar enfermedades mediadas por IL-1, tales como artritis reumatoide, osteoartritis y otras afecciones inflamatorias.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 15 Desarrollo de anticuerpos

- 20 La inflamación es la respuesta del cuerpo a lesiones causadas por daños mecánicos, infección o estimulación antigénica. Las reacciones inflamatorias a menudo se expresan de forma patológica. Dichas afecciones surgen cuando la inflamación se expresa de una manera exagerada, se estimula inapropiadamente o persiste después de la eliminación del agente nocivo.

- 25 La respuesta inflamatoria está mediada, *entre otras*, por las citocinas. Una de las citocinas inflamatorias más potentes descubierta es interleucina 1 (IL-1). Un incremento de la señalización de IL-1 provoca una inflamación persistente asociada con varias enfermedades y se piensa que IL-1 es un mediador clave en muchas enfermedades y afecciones médicas. Esta citocina se fabrica principalmente (aunque no exclusivamente) por parte de células del linaje de macrófagos/monocitos y se puede producir de dos formas: IL-1 alfa (IL-1 α) e IL-1 beta (IL-1 β).

- 30 La IL-1 estimula las respuestas celulares interactuando con un complejo de receptor heterodimérico compuesto por dos proteínas de la transmembrana, el receptor de IL-1 de tipo 1 (IL-1R1) y la proteína accesoria del receptor de IL-1 (IL-1RAcP). IL-1 se une primero a IL-1R1; después se recluta IL-1RAcP para este complejo (Greenfeder *et al.*, 1995, *J. Biol. Chem.* 270:13757-13765; Yoon y Dinarello, 1998, *J. Immunology* 160:3170-3179; Cullinan *et al.*, 1998, *J. Immunology* 161:5614-5620), seguido de la transducción de señales que tiene como resultado la inducción de una respuesta celular.

- 35 Los estudios de unión basados en células sugieren que IL-1RAcP estabiliza el complejo de señalización de IL-1R ralentizando la constante de disociación del ligando (Wesche *et al.*, 1998, *FEBS Letters* 429:303-306). Mientras que la interacción de la IL-1 con IL-1R se ha caracterizado a fondo, la interacción de IL-1RAcP con el receptor unido al ligando sigue estando deficientemente definida. Dado que IL-1RAcP no tiene una afinidad significativa por IL-1 o IL-1R1 sola, pero tiene una elevada afinidad por el complejo, se deduce que los nuevos sitios de unión para IL-1RAcP son creados por el fenómeno de unión IL-1/IL-1R, que pueden incluso incluir contribuciones de residuos de IL-1 (Ettorre *et al.*, 1997, *Eur. Cytokine Netw.* 8:161-171). Otra molécula, el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra) compite con IL-1 α e IL-1 β por la unión al receptor, pero no recluta IL-1RAcP, lo cual resulta en un receptor ocupado pero que no señala. La actividad de la IL-1 puede además contrarrestarse mediante IL-1R de tipo II, un receptor señuelo que se une al ligando, pero que no participa en la señalización debido a que tiene un dominio intracelular truncado. IL-1ra e IL-1R de tipo II actúan reduciendo la gravedad y la duración de fenómenos inflamatorios mediados por IL-1 (Wesche *et al.*, 1998, *FEBS Letters* 429:303-306; Dripps *et al.*, 1991, *J. Biol. Chem.* 266:10331-10336; Dripps *et al.*, 1991, *J. Biol. Chem.* 266:20331-20335).

- 50 Los inhibidores de interleucina-1 se pueden producir a partir de cualquier proteína capaz de prevenir específicamente la activación de receptores celulares de IL-1, que puede resultar de un cierto número de mecanismos. Dichos mecanismos incluyen la reducción de la producción de IL-1, la unión de IL-1 libre, la interferencia con la unión de IL-1 a IL-1R, la interferencia con la formación del complejo IL-1R-IL-1RAcP, o la interferencia con la modulación de la señalización de IL-1 tras la unión a su receptor. Clases de inhibidores de IL-1 incluyen:

- 55
- Antagonistas del receptor de interleucina-1 tales como IL-1ra, como se describe más adelante;
 - Anticuerpos monoclonales anti-IL-1R (*p. ej.*, como se describe en la solicitud de patente europea publicada nº EP 623674;
 - Proteínas de unión a IL-1 tales como receptores solubles de IL-1 (*p. ej.*, como se describe en las patentes de EE.UU. nºs 5.492.888; 5.488.032; 5.464.937; 5.319.071; y 5.180.812;
 - 60 • Anticuerpos monoclonales anti-IL-1 (*p. ej.*, como se describe en las publicaciones de solicitudes de patentes internacionales nº WO 9501997, WO 9402627, WO 9006371, pat. de EE.UU. nº 4.935.343, EP 364778, EP 267611 y EP 220063;
 - Proteínas accesorias al receptor de IL-1 y anticuerpos de las mismas (*p. ej.*, como se describe en las publicaciones de solicitudes de patente internacional nº WO 96/23067 y WO 99/37773; y
 - 65 • Inhibidores de la enzima convertidora de interleucina-1 β (ICE – siglas en inglés) o caspasa I (*p. ej.*, como se describe en las publicaciones de solicitudes de patente internacional nº WO 99/46248, WO 99/47545 y WO

99/47154, que se pueden usar para inhibir la producción y secreción de IL-1 β ;

- Inhibidores de interleucina-1 β proteasa; y
- Otros compuestos y proteínas que bloquean la síntesis *in vivo* o la liberación extracelular de IL-1.

5 Inhibidores de IL-1 ilustrativos se describen en las referencias siguientes: patentes de EE.UU. N $^{\circ}$ s 5.747.444; 5.359.032; 5.608.035; 5.843.905; 5.359.032; 5.866.576; 5.869.660; 5.869.315; 5.872.095; 5.955.480; y 5.965. 564; publicaciones de solicitud de patente internacional N $^{\circ}$ W098/21957, W096/09323, W091/17184, W096/40907, W098/32733, W098/42325, W098/44940, W098/47892, W098/56377, W099/03837, W099/06426, W099/06042, W091/17249, W098/32733, W098/17661, W097/08174, W095/34326, W099/36426, y W099/36415; publicaciones de solicitud de patente europea N $^{\circ}$ s EP534978 y EP89479; y la solicitud de patente francesa n $^{\circ}$ FR 2762514. Sims J.E. et al. describe anticuerpos conocidos contra receptores de tipo I y de tipo II de interleucina-1 (IL-1) y concluye que el receptor de tipo I (IL-1R1) es el responsable de mediar en la transducción de señales tras la unión a IL-1.

15 El antagonista del receptor de interleucina 1 (IL-1ra) es una proteína humana que actúa como un inhibidor natural de la interleucina-1 y es un miembro de la familia de IL-1, que incluye IL-1 α e IL-1 β . Antagonistas preferidos del receptor (incluidos IL-1ra y variantes y derivados del mismo), así como métodos de fabricarlos y utilizarlos se describen en la patente de EE.UU. n $^{\circ}$ 5.075.222; las publicaciones de solicitud de patente internacional N $^{\circ}$ s WO 91/08285; WO 91/17184; W092/16221; W093/21946; WO 94/06457; WO 94/21275; WO 94/21235; DE 4219626, WO 94/20517; WO 96/22793; WO 97/28828; y WO 99/36541, la solicitud de patente australiana n $^{\circ}$ AU9173636; y la solicitud de patente francesa n $^{\circ}$ FR2706772; Las proteínas incluyen formas glicosiladas así como no glicosiladas de los antagonistas de receptor de IL-1.

25 Específicamente se divulgan tres formas útiles de IL-1ra y variantes del mismo y se describen en la patente de EE.UU. n $^{\circ}$ 5.075.222 ("la patente '222"). IL-1ra α se caracteriza mediante SDS-PAGE como una molécula de 22-23 kD que tiene un punto isoeléctrico aproximado de 4,8, que eluye en una columna Mono Q FPLC en NaCl aproximadamente 52 mM en tampón Tris, pH 7,6. IL-1ra β se ha caracterizado como una proteína de 22-23 kD que eluye en una columna Mono Q en NaCl 48 mM. Tanto IL-1ra α como IL-1ra β están glicosilados. IL-1ra γ se caracteriza como una proteína de 20 kD que eluye en una columna Mono Q en NaCl 48 mM y no está glicosilado. La patente '222 también divulga métodos para aislar los genes responsables de la codificación de inhibidores, la clonación del gen en vectores adecuados y tipos celulares y la expresión del gen para producir los inhibidores. Aunque eficaz, IL-1ra tiene una semivida relativamente corta. En el uso actual, IL-1ra se administra una vez al día. Por tanto, la técnica se beneficiaría de un antagonista del receptor de IL-1 con una semivida apreciablemente más larga.

35 La prevención de la señalización de IL-1 inhibiendo la unión de IL-1 al receptor de IL-1 es una atractiva estrategia terapéutica para tratar enfermedades mediadas por IL-1. En la técnica existe la necesidad de inhibidores clínicamente eficaces de la vía de señalización de IL-1 que puedan atenuar los efectos de las enfermedades mediadas por IL-1 y sean adecuados para su liberación en pacientes humanos. Un anticuerpo humano que bloquea la señalización de IL-1 sería particularmente ventajoso para satisfacer esta necesidad y proporcionaría una semivida más larga que la terapia disponible en la actualidad.

40 **SUMARIO DE LA INVENCIÓN**

La invención proporciona anticuerpos monoclonales que se unen al receptor de interleucina -1 de tipo 1 (IL-1 R1) según se define en los siguientes apartados 1 a 17:

- 45 1. Un anticuerpo humano aislado que se une específicamente al receptor de interleucina 1 de tipo 1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:
- 50 a. regiones de armazón de la cadena pesada humana, una región CDR1 de la cadena pesada, en donde la región CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, una región CDR2 de la cadena pesada, en donde la región CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64 y una región CDR3 de la cadena pesada, en donde la región CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67; y
- 55 b. regiones de armazón de la cadena ligera humana, una región CDR1 de la cadena ligera, en donde la región CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70, una región CDR2 de la cadena ligera, en donde la región CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72 y una región CDR3 de la cadena ligera, en donde la región CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74.
- 60 2. Un anticuerpo humano aislado que se une específicamente al receptor de interleucina 1 de tipo 1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:
- 65 a. regiones de armazón de la cadena pesada humana, una región CDR1 de la cadena pesada, en donde la región CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62, una región CDR2 de la cadena pesada, en donde la región CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y una región CDR3 de la cadena pesada, en donde la región CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68; y

- 5 b. regiones de armazón de la cadena ligera humana, una región CDR1 de la cadena ligera humana, en donde la región CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70, una región CDR2 de la cadena ligera, en donde la región CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72 y una región CDR3 de la cadena ligera, en donde la región CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74.
- 10 3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo del apartado 2, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAVSGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWNDGE
NKHHAGSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRYFDWLLFEYWGGG T
LVTVSS, y una cadena ligera que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNRATGIPA
RFSGSGSGTDFLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGKVEIK.
- 15 4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo del apartado 1, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAGIWN DGI
NKYHAHSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSPRAEDTAVYYCARAR SFDWLLFEFWGQGT
LVTVSS, y una cadena ligera que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNRATGIPA
RFSGSGSGTDFLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGKVEIK.
- 20 5. El anticuerpo de uno cualquiera de los apartados 1 a 4, en donde la cadena pesada y la cadena ligera están conectadas mediante un enlazador flexible para formar un anticuerpo de cadena sencilla.
6. El anticuerpo del apartado 5, que es un anticuerpo Fv de cadena sencilla.
- 30 7. El anticuerpo de uno cualquiera de los apartados 1 a 4, que es un anticuerpo Fab, un anticuerpo Fab' o un anticuerpo (Fab')₂.
8. El anticuerpo de uno cualquiera de los apartados 1 a 7, en donde el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano.
- 35 9. El anticuerpo de uno cualquiera de los apartados 1 a 4, que es un anticuerpo IgG₂.
10. El anticuerpo de uno cualquiera de los apartados 1 a 9, que se une específicamente al polipéptido de SEQ ID NO: 76.
- 40 11. El anticuerpo del apartado 10, que se une específicamente a la secuencia de aminoácidos YSV.
12. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos de uno cualquiera de los apartados 1 a 10.
- 45 13. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico del apartado 12.
14. Una célula hospedadora que contiene el vector de expresión del apartado 13.
- 50 15. Un método para preparar el anticuerpo de uno cualquiera de los apartados 1 a 10, que comprende las etapas de:
- 55 a) insertar en un vector de expresión la molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena pesada, una región variable de la cadena pesada, una región constante de la cadena ligera o una región variable de la cadena ligera del anticuerpo de uno cualquiera de los apartados 1 a 10;

- b) introducir el vector de expresión en una célula hospedadora para expresar el gen; y
- c) aislar el anticuerpo.

- 5 16. El anticuerpo de uno cualquiera de los apartados 1 a 10 para uso en el tratamiento de una enfermedad
mediada por IL-1 en un paciente, en donde la enfermedad mediada por IL-1 se selecciona de enfermedad
pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o EPOC, proteínosis alveolar pulmonar, neumopatía
10 inducida por bleomicina, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis pulmonar inducida por
radiación, fibrosis quística, acumulación de colágeno en los pulmones, síndrome del distrés respiratorio agudo
o ARDS, displasia bronquio-pulmonar o BPD, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas seleccionadas
de enfisema y bronquitis crónica, enfermedad pulmonar fibrótica crónica, asbestosis, pneumoconiosis del
trabajador del carbón, silicosis, bronquiolitis obliterante con neumonía organizada, sarcoidosis pulmonar, rinitis
alérgica, dermatitis de contacto, dermatitis atópica, diabetes, enfermedad del intestino inflamatorio, artritis
15 reumatoide y asma.
17. Una composición farmacéutica que comprende un soporte farmacéuticamente aceptable y una cantidad
terapéuticamente eficaz del anticuerpo de uno cualquiera de los apartados 1 a 10.

20 Preferiblemente, los anticuerpos inhiben la señalización de IL-1 compitiendo con la unión de IL-1 β y de IL-1 α a IL-1R1.
La presente invención también proporciona líneas celulares de hibridoma que producen, y lo más preferiblemente,
secretan en el medio de cultivo celular los anticuerpos monoclonales de la invención. Los anticuerpos de la invención
bloquean con éxito la señalización de IL-1 en células humanas y, de este modo, son útiles en el tratamiento de
25 pacientes con enfermedades mediadas por la IL-1. La presente descripción se refiere a proteínas de fusión que
comprenden la secuencia de una región Fc de anticuerpo y una o más secuencias seleccionadas del grupo que
consiste en las SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO 20,
SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34,
SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 40. Dichas moléculas se pueden preparar utilizando métodos como se
describe, por ejemplo, en el documento WO 00/24782. Dichas moléculas se pueden expresar, por ejemplo, en células
30 de mamíferos (*p. ej.*, células de ovario de hámster chino) o células bacterianas (*p. ej.*, células de *E. coli*).

En determinados aspectos, la descripción se refiere a anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales, más
preferiblemente anticuerpos humanos que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena
pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en cualquiera de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6
35 o SEQ ID NO: 8, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional
de los mismos.

La descripción se refiere a anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales, más preferiblemente anticuerpos
humanos que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena ligera comprende una
40 secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 4, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento
de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos.

En determinados aspectos, los anticuerpos descritos en esta memoria comprenden una cadena pesada y una cadena
ligera, en donde la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge
45 en cualquiera de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16, o un fragmento de unión a antígeno o un
fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos. En otros aspectos, la región variable de la
cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 18, o un
fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos. En
aspectos adicionales, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en cualquiera
50 de SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO:
32, SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 36, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina
inmunológicamente funcional de los mismos. Todavía en otros aspectos, la cadena ligera comprende una secuencia de
aminoácidos tal como se recoge en cualquiera de SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 40, o un fragmento de unión a
antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos. Dichas cadenas de
55 anticuerpos son útiles para preparar anticuerpos que se unen específicamente a IL-1R1 y también en la preparación de
anticuerpos biespecíficos en los que la molécula resultante se une a IL-1R1 y/o a otra molécula diana (*p. ej.*, TNF o
receptor de TNF).

La descripción también se refiere a anticuerpos que se unen específicamente a IL-1R1, en donde la cadena pesada
comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se
60 recoge en SEQ ID NO: 10, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente
funcional de los mismos, y la cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera que comprende una
secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 12, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento
de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos.

65 En determinados aspectos, la descripción se refiere a anticuerpos que comprenden una cadena pesada y una cadena
ligera, en donde la cadena pesada comprende una primera región variable y en donde la primera región variable

- comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos el 90 %, más preferiblemente de al menos el 95 %, y lo más preferiblemente de aproximadamente el 99 % con la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 10 y en donde la cadena ligera comprende una segunda región variable y en donde la segunda región variable comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos el 90 %, más preferiblemente de al menos el 95 %, y lo más preferiblemente de aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 12, en donde el anticuerpo interactúa con IL-1R1.
- La descripción se refiere a anticuerpos que se unen específicamente a IL-1R1, en donde la cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 14, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos, y la cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos como se recoge en SEQ ID NO: 12, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos.
- En determinados aspectos, la descripción se refiere a anticuerpos que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende una primera región variable y en donde la primera región variable comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos el 90 %, más preferiblemente de al menos el 95 %, y lo más preferiblemente de aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 14, y en donde la cadena ligera comprende una segunda región variable y en donde la segunda región variable comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos el 90 %, más preferiblemente de al menos el 95 %, y lo más preferiblemente de aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 12, en donde el anticuerpo interactúa con IL-1R1.
- La descripción se refiere a anticuerpos que se unen específicamente a IL-1R1, en donde la cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 16, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos, y la cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 18, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos.
- En determinados aspectos, la descripción se refiere a anticuerpos que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende una primera región variable y en donde la primera región variable comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos el 90 %, más preferiblemente de al menos el 95 %, y lo más preferiblemente de aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 16, y en donde la cadena ligera comprende una segunda región variable y en donde la segunda región variable comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 90 %, más preferiblemente de al menos el 95 %, y lo más preferiblemente de aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 18, en donde el anticuerpo interactúa con IL-1R1.
- La descripción también se refiere a anticuerpos que se unen específicamente a IL-1R1, en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 30, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos, y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 38, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos.
- La descripción se refiere además a anticuerpos que se unen específicamente a IL-1R1, en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 36, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos, y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 40, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos.
- La invención también proporciona realizaciones de todos lo anterior que son anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos Fv de cadena sencilla, anticuerpos Fab, anticuerpos Fab' y anticuerpos (Fab')₂.
- En aspectos particulares, la descripción se refiere a una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en cualquiera de SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 40, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos.
- Además, la descripción se refiere a una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en cualquiera de SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO 32, SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO 36, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos.
- La invención también se refiere a anticuerpos humanos aislados que se unen específicamente a IL-1R1, en donde el anticuerpo comprende: (a) regiones de armazón de la cadena pesada humana, una región CDR1 de la cadena pesada

humana, una región CDR2 de la cadena pesada humana y una región CDR3 de la cadena pesada humana; y (b) regiones de armazón de la cadena ligera humana, una región CDR1 de la cadena ligera humana, una región CDR2 de la cadena ligera humana y una región CDR3 de la cadena ligera humana. En determinados aspectos, la región CDR1 de la cadena pesada humana puede ser la región CDR1 de la cadena pesada de 26F5 o 27F2 tal como se muestra en la Figura 10, y la región CDR1 de la cadena ligera humana puede ser la región CDR1 de la cadena ligera de 26F5 o 27F2 como se muestra en la Figura 11. En otros aspectos, la región CDR2 de la cadena pesada humana puede ser la región CDR2 de la cadena pesada humana de 26F5 o 27F2 tal como se muestra en la Figura 10, y la región CDR2 de la cadena ligera humana puede ser la región CDR2 de la cadena ligera humana de 26F5 o 27F2 tal como se muestra en la Figura 11. Todavía en otros aspectos, la región CDR3 de la cadena pesada humana es la región CDR3 de la cadena pesada de 26F5 o 27F2 tal como se muestra en la Figura 10 y la región CDR3 de la cadena ligera humana es la región CDR3 de la cadena ligera de 26F5 o 27F2 tal como se muestra en la Figura 11.

Además, la invención proporciona un anticuerpo humano aislado, como se define en las reivindicaciones, que se une específicamente al receptor de tipo 1 de la interleucina-1 (IL-1R1), que comprende: una región CDR1 de la cadena pesada humana, en donde la CDR1 de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61 o SEQ ID NO: 62; una región CDR2 de la cadena pesada humana, en donde la CDR2 de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 64 o SEQ ID NO: 65; y/o una región CDR3 de la cadena pesada humana, en donde la CDR3 de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N: 67 o SEQ ID NO: 68.

La invención también proporciona un anticuerpo humano aislado, como se define en las reivindicaciones, que se une específicamente al receptor de tipo 1 de la interleucina-1 (IL-1R1), que comprende: una región CDR1 de la cadena ligera humana, en donde la CDR1 de la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70; una región CDR2 de la cadena ligera humana, en donde la CDR2 de la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72; y/o una región CDR3 de la cadena ligera humana, en donde la CDR3 de la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la invención se unen al tercer dominio de IL-1R1, que se muestra en la Figura 17. Preferiblemente, el epítipo para un anticuerpo de la invención consiste en la secuencia de aminoácidos YSV, al que se alude como Epítipo 4 en esta memoria y se muestra en la Figura 24. La descripción se refiere, además, a proteínas de fusión y otras moléculas capaces de unirse al Epítipo 4 (junto con los anticuerpos mencionados anteriormente, a los que se alude colectivamente en esta memoria como "participantes en la unión específica") tal como se pueden preparar usando métodos tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO 00/24782.

Estas moléculas se pueden expresar, por ejemplo, en células de mamíferos (*p. ej.*, células de ovario de hámster chino) o células bacterianas (*p. ej.*, células de *E. coli*).

Además, la invención proporciona un método para representar en mapa el epítipo de un antígeno seleccionado. En un aspecto, el método comprende las etapas de: (a) generar un conjunto de proteínas de fusión, en donde cada una de las proteínas de fusión comprende (i) avidina y (ii) un fragmento del antígeno; (b) rastrear el conjunto de proteínas de fusión en cuanto a la unión a uno o más participantes en la unión específica del antígeno; (c) aislar las proteínas de fusión en un medio que comprende biotina, de modo que la avidina se une a la biotina; y (d) analizar las proteínas de fusión unidas por el participante o los participantes en la unión específica para determinar los sitios de unión sobre el antígeno para el participante o los participantes en la unión específica. En un aspecto particular, los participantes en la unión específica son anticuerpos.

En realizaciones adicionales, la invención proporciona métodos para tratar una enfermedad, afección o trastorno mediado por IL-1, como se define en las reivindicaciones, que comprenden la etapa de administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de uno o una pluralidad de anticuerpos monoclonales de la invención o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional a un individuo que lo necesita.

La descripción se refiere también a métodos para detectar el nivel de IL-1R1 en una muestra biológica, que comprenden la etapa de poner en contacto la muestra con un anticuerpo monoclonal de la invención o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Los anticuerpos anti-IL-1R de la invención se pueden emplear en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitivos, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos, ensayos de inmunoprecipitación y ensayos de inmunosorbente ligado a enzima (ELISA) (véase, Sola, 1987, Monoclonal Antibodies A Manual of Techniques, págs. 147-158, CRC Press, Inc.) para la detección y cuantificación de IL-1R. Los anticuerpos se pueden unir a IL-1R con una afinidad que es adecuada para el método de ensayo que se esté empleando,

Realizaciones específicas preferidas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción más detallada de determinadas realizaciones preferidas y las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las Figuras 1A-1B representan una secuencia de ADNc (Fig. 1A) que codifica una región constante de IgG1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-IL-1R1 humano (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de aminoácidos (Fig. 1B) de una región constante de IgG1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-IL-1R1 humano (SEQ ID NO: 2).

- 5 Las Figuras 2A-2B representan una secuencia de ADNc (Fig. 2A) que codifica una región constante de la cadena kappa del anticuerpo anti-IL-1R1 humano (SEQ ID NO: 3) y la secuencia de aminoácidos (Fig. 2B) de una región constante de la cadena kappa del anticuerpo anti-IL-1R1 humano (SEQ ID NO: 4).
- 10 Las Figuras 3A-3B representan una secuencia de ADNc (Fig. 3A) que codifica una región constante de IgG2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-IL-1R1 humano (SEQ ID NO: 5) y la secuencia de aminoácidos (Fig. 3B) de una región constante de IgG2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-IL-1R1 humano (SEQ ID NO: 6).
- 15 Las Figuras 4A-4B representan una secuencia de ADNc (Fig. 4A) que codifica una región constante de IgG4 de la cadena pesada del anticuerpo anti-IL-1R1 humano (SEQ ID NO: 7) y la secuencia de aminoácidos (Fig. 4B) de una región constante de IgG4 de la cadena pesada del anticuerpo anti-IL-1R1 humano (SEC ID NO: 8)
- Las Figuras 5A-5B representan una secuencia de ADNc (Fig. 5A) que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-IL-1R1 26F5 (SEQ ID NO: 9) y la secuencia de aminoácidos (Fig. 5B) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-IL-1R1 26F5 (SEQ ID NO: 10).
- 20 Las Figuras 6A-6B representan una secuencia de ADNc (Fig. 6A) que codifica la región variable de la cadena kappa del anticuerpo anti-IL-1R1 26F5 (SEQ ID NO: 11) y la secuencia de aminoácidos (Fig. 6B) de la región variable de la cadena kappa del anticuerpo anti-IL-1R1 26F5 (SEQ ID NO: 12).
- 25 Las Figuras 7A-7B representan una secuencia de ADNc (Fig. 7A) que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-IL-1R1 27F2 (SEQ ID NO: 13) y la secuencia de aminoácidos (Fig. 7B) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-IL-1R1 27F2 (SEQ ID NO: 14).
- 30 Las Figuras 8A-8B representan una secuencia de ADNc (Fig. 8A) que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-IL-1R1 15C4 (SEQ ID NO: 15) y la secuencia de aminoácidos (Fig. 8B) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-IL-1R1 15C4 (SEQ ID NO: 16).
- 35 Las Figuras 9A-9B representan una secuencia de ADNc (Fig. 9A) que codifica la región variable de la cadena kappa del anticuerpo anti-IL-1R1 15C4 (SEQ ID NO: 17) y la secuencia de aminoácidos (Fig. 9B) de la región variable de la cadena kappa del anticuerpo anti-IL-1R1 15C4 (SEQ ID NO: 18).
- 40 La Figura 10 muestra una alineación de una secuencia de aminoácidos de cadenas pesadas de anticuerpos anti-IL-1R1 designados 15C4, 27F2 y 26F5. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) están subrayadas. La CDR1 para 26F5 está designada en SEQ ID NO: 61; para 27F2 está designada en SEQ ID NO: 62; para 15C4 está designada en SEQ ID NO: 63. La CDR2 para 26F5 está designada en SEQ ID NO: 64; para 27F2 está designada en SEQ ID NO: 65; para 15C4 está designada en SEQ ID NO: 66. La CDR3 para 26F5 está designada en la SEQ ID NO: 67; para 27F2 está designada en SEQ ID NO: 68; para 15C4 está designada en SEQ ID NO: 69.
- 45 La Figura 11 muestra la alineación de una secuencia de aminoácidos de cadenas ligeras de anticuerpos anti-IL-1R1-y designados 15C4, 27F2 y 26F5. La CDR1 para 26F5/27F2 está designada en SEQ ID NO: 70; para 15C4 está designada en SEQ ID NO: 71. La CDR2 para 26F5/27F2 está designada en SEQ ID NO: 72; para 15C4 está designada en SEQ ID NO: 73. La CDR3 para 26F5/27F2 está designada en SEQ ID NO: 74; para 15C4 está designada en SEQ ID NO: 75.
- 50 La Figura 12 es un gráfico que ilustra el efecto inhibitorio de anticuerpos anti-IL1R1 sobre la formación del complejo IL-1R/IL-1 β /IL-1RAcP.
- 55 La Figura 13 es un gráfico que muestra el efecto inhibitorio de un anticuerpo monoclonal anti-IL1R1 como se describe en esta memoria y se designa 15C4 sobre la formación del complejo IL-1R/IL-1 α /IL-1RAcP.
- La Figura 14 es un gráfico que representa la capacidad de anticuerpos anti-IL-1R1 de bloquear la unión de IL-1 β sin interferir significativamente en la unión de IL-1ra en comparación con la IgG control.
- 60 La Figura 15A es un gráfico que muestra la inhibición de la producción de IL-6 en condrocitos humanos primarios mediante anticuerpos anti-IL-1R1 identificados en esta memoria y designados 15C4, 26F5 y 27F2 en comparación con IL-1ra.
- 65 La Figura 15B es un gráfico que muestra la inhibición de la producción de IL-6 en condrocitos humanos primarios mediante IL-1ra y los anticuerpos monoclonales 15C4 y 27F2 en comparación con la clase de anticuerpos monoclonales representados por 10H7 y 24E12.
- La Figura 16 es un gráfico que muestra la inhibición de la producción de IL-6 en sangre entera humana por parte de los anticuerpos monoclonales anti-IL-1R1 designados 15C4, 26F5 y 27F2 en comparación con IL-1ra.

La Figura 17 representa secuencias del 3^{er} dominio de IL-1R1 de aminoácidos (SEQ ID NO: 76) y nucleótidos (SEQ ID NO: 77) humanos y de nucleótidos (SEQ ID NO: 78) y aminoácidos (SEQ ID NO: 79) de rata. Las barras numeradas encima de la secuencia humana indican los 15 sitios diferentes mutados para construir las 15 proteínas mutadas diferentes. Los residuos de rata introducidos mediante mutación se indican debajo de la secuencia de ácido nucleico de rata.

La Figura 18 muestra análisis de transferencia Western que demuestra reconocimiento del anticuerpo monoclonal anti-IL-1R1 de mutantes de IL-1R1.

La Figura 19 es un dibujo que representa (I) la activación de la vía de señalización de IL-1, que se inicia con la unión de IL-1 β a IL-1R1 y el reclutamiento de IL-1RacP, y tres clases de anticuerpos anti-IL-1R1: (II) bloqueantes de IL-1 de epítipo del 3^{er} dominio, (III) bloqueantes de RacP del epítipo del 3^{er} dominio y (IV) bloqueantes de IL-1 del epítipo del 1^{er}/2^o dominio.

La Figura 20 representa la estructura cristalina de 15C4 y 27F2 con la mutación 10 como se describe en esta memoria. Los residuos en gris indican los epítopos de 15C4 y 27F2.

La Figura 21 representa los epítopos de 15C4 en el tercer dominio del IL-1R1 extracelular.

La Figura 22 representa los epítopos de 24E12 en el tercer dominio del IL-1R1 extracelular.

La Figura 23 representa la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 59) de la proteína quimérica avidina-IL-1R1-FLAG humana de la invención.

La Figura 24 representa la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 60) de una proteína quimérica avidina-IL-1R1-FLAG de cinomolgo. La avidina de pollo recombinante (en cursiva) está unida al dominio extracelular maduro de IL-1R1 de cinomolgo (subrayado con la marca FLAG en el extremo C en negritas) a través de un enlazador de 6 aminoácidos. Cuatro aminoácidos de IL-1R1 humano que se introdujeron solos y en combinación con la secuencia de cinomolgo están en negritas bajo la secuencia de cinomolgo. El Epítipo 4 está en negritas, cursiva y subrayado.

La Figura 25A muestra un análisis de transferencia Western de la unión del anticuerpo anti-IL-1R1 humano (anti-huIL-1R1) a IL-1R1. El * indica que los anticuerpos se usaron a 5 μ g/ml, mientras que en los anticuerpos restantes se usaron a 1 μ g/ml.

La Figura 25B muestra un resumen del análisis densitométrico de un conjunto duplicado de experimentos de transferencia Western.

La Figura 26 muestra gráficos que representan la unión de anticuerpos anti-huIL-1R1 a proteínas avidina-IL-1R1-FLAG en un ensayo de unión multiplexado basado en perlas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE DETERMINADAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Los encabezados de sección usados en esta memoria son únicamente con motivos organizativos y no deben interpretarse como limitantes de la materia objeto descrita.

Definiciones

Una enfermedad o afección médica se considera que es una "enfermedad mediada por interleucina-1 (IL-1)" si la enfermedad o afección médica que se produce de forma natural o es inducida experimentalmente está asociada con niveles elevados de IL-1 en fluidos corporales o tejido, o si las células o tejidos tomados del cuerpo producen niveles elevados de IL-1 en cultivo. Niveles elevados de IL-1 pueden incluir, por ejemplo, niveles que exceden de los que normalmente se encuentran en una célula o tejido particular, o puede ser cualquier nivel detectable de IL-1 en una célula o tejido que normalmente no expresa IL-1. En muchos casos, las enfermedades mediadas por IL-1 también se reconocen por las siguientes dos condiciones adicionales: (1) hallazgos patológicos asociadas con la enfermedad o afección médica pueden simularse experimentalmente en animales mediante la administración de IL-1 o la suprarregulación de la expresión de IL-1; y (2) una patología inducida en modelos animales experimentales de la enfermedad o afección médica se puede inhibir o anular mediante tratamiento con agentes que inhiben la acción de IL-1. En la mayoría de las enfermedades mediadas por IL-1 se cumplen al menos dos de las tres condiciones y en muchas enfermedades mediadas por IL-1 se cumplen las tres condiciones.

Una lista no exclusiva de enfermedades mediadas por IL-1 agudas y crónicas incluye, pero no se limita a las siguientes: pancreatitis aguda; esclerosis lateral amiotrófica (ALS – siglas en inglés), enfermedad de Alzheimer; caquexia/anorexia, incluida la caquexia inducida por SIDA, asma y otras enfermedades pulmonares, aterosclerosis, vasculitis autoinmune, síndrome de fatiga crónica, enfermedades asociadas con *Clostridium*, incluida la diarrea asociada con *Clostridium*; afecciones e indicaciones coronarias, incluida la insuficiencia congestiva cardíaca, restenosis coronaria, infarto de miocardio, disfunción miocárdica (p. ej., relacionada con sepsis) o injerto de derivación arterial coronaria; cáncer, tal

5 como mieloma múltiple y leucemia mielógena (p. ej., AML o CML – siglas en inglés) y otras leucemias, así como metástasis tumorales; diabetes (p. ej., diabetes dependiente de insulina); endometriosis; fiebre; fibromialgia; glomerulonefritis; enfermedad del injerto frente al huésped/rechazo de trasplante; choque hemorrágico; hiperalgesia, enfermedad intestinal inflamatoria, afecciones inflamatorias de una articulación, incluyendo osteoartritis, artritis psoriásica y artritis reumatoide; enfermedad ocular inflamatoria tal como puede estar asociada, p. ej., con trasplante de córnea; isquemia, incluyendo isquemia cerebral (p. ej., lesión cerebral como resultado de traumatismo, epilepsia, hemorragia o apoplejía, cada uno de los cuales puede conducir a neurodegeneración); enfermedad de Kawasaki; alteración del aprendizaje; enfermedades pulmonares (p. ej., ARDS – siglas en inglés); esclerosis múltiple; miopatías (p. ej., metabolismo de proteína del músculo, especialmente en sepsis); neurotoxicidad (p. ej., como la inducida por el VIH); osteoporosis; dolor, incluido el dolor relacionado con el cáncer; enfermedad de Parkinson; enfermedad periodontal; parto prematuro; psoriasis, lesión por reperfusión, choque séptico; efectos secundarios de la radioterapia; enfermedad de la articulación mandibular temporal, alteraciones del sueño; uveítis; o una afección inflamatoria que se produce por distensión, esguince, lesión de cartílago, traumatismo, cirugía ortopédica, infección u otros procesos patológicos. Métodos de la invención para tratar estas enfermedades agudas y crónicas mediadas por IL-1, así como otras enfermedades y afecciones mediadas por IL-1, se describen más adelante.

20 Se pueden usar técnicas convencionales para preparar ADN recombinante, realizar síntesis de oligonucleótidos, y practicar cultivo y transformación de tejidos (p. ej., electroporación, transfección o lipofección). Se pueden realizar reacciones enzimáticas y técnicas de purificación de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como normalmente se efectúan en la técnica o tal como se describe en esta memoria. Las técnicas y procesos anteriores pueden realizarse, en general, de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y tal como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3^{ra} ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura usada en relación con, y los procesos y técnicas de laboratorio de la química analítica, la química orgánica sintética y la química medicinal y farmacéutica descritas en esta memoria son los bien conocidos y usados habitualmente en la técnica. Se pueden usar técnicas estándares para síntesis química, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y suministro, y tratamiento de pacientes.

30 Como se utiliza de acuerdo con la presente descripción, se entenderá que los términos y expresiones siguientes, a menos que se indique lo contrario, tendrán los significados siguientes:

35 La expresión “polinucleótido aislado” significa que el polinucleótido sujeto (1) no está asociado (de forma covalente o no covalente) con la totalidad o una parte de otros polinucleótidos con los que el polinucleótido sujeto está asociado en la naturaleza, (2) está asociado con una molécula con la que no está asociado en la naturaleza o (3) no se produce en la naturaleza en asociación con cualesquiera otros polinucleótidos. Dicho polinucleótido aislado puede ser ADN, ADNc, ARNm u otro ARN genómico, de origen sintético o cualquier combinación de los mismos.

40 A la expresión “proteína aislada” se alude en esta memoria, significa que una proteína sujeto (1) está exenta de al menos algunas otras proteínas con las que normalmente se encontraría, (2) está esencialmente exenta de otras proteínas de la misma fuente, p. ej. de la misma especie, (3) es expresada por una célula de una especie diferente, (4) ha sido separada de al menos aproximadamente el 50 por ciento de los polinucleótidos, lípidos, hidratos de carbono u otros materiales con los que está asociada en la naturaleza, (5) no está asociada (mediante interacción covalente o no covalente) con partes de una proteína con la que la “proteína aislada” está asociada en la naturaleza, (6) está asociada operativamente (mediante interacción covalente o no covalente) con un polipéptido con el que no está asociada en la naturaleza o (7) no se produce en la naturaleza. ADN, ADNc, ARNm u otro ARN genómico, de origen sintético o cualquier combinación de los mismos puede codificar dicha proteína aislada. Preferiblemente, la proteína aislada está sustancialmente exenta de proteínas o polipéptidos u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural que interferirían con su uso terapéutico, diagnóstico, profiláctico, de investigación o de otro tipo.

50 Los términos “polipéptido” o “proteína” significan una o más cadenas de aminoácidos, en donde cada una de las cadenas comprende aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos, y en donde dicho polipéptido o proteína puede comprender una pluralidad de cadenas unidas no covalentemente y/o covalentemente entre sí mediante enlaces peptídicos, que tienen la secuencia de proteínas nativas, es decir, proteínas producidas por células que se producen de forma natural y específicamente no recombinantes, o células sometidas a ingeniería genética o recombinantes, y comprenden moléculas que tienen la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa, o moléculas que tienen deleciones, adiciones y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de la secuencia nativa. Los términos “polipéptido” y “proteína” abarcan específicamente anticuerpos anti-IL1-R1 o secuencias que tienen deleciones, adiciones y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de un anticuerpo anti-ILR-1R1. Por tanto, un “polipéptido” o una “proteína” puede comprender una (denominado “monómero”) o una pluralidad (denominado “multímero”) de cadenas de aminoácidos.

65 La expresión “fragmento polipeptídico” se refiere a un polipéptido que puede ser monomérico o multimérico, que tiene una deleción amino-terminal, una deleción carboxilo-terminal y/o una deleción o sustitución interna de un polipéptido que se produce de forma natural o producido de forma recombinante. En determinadas realizaciones, un fragmento polipeptídico puede comprender una cadena de aminoácidos de al menos 5 a aproximadamente 500 aminoácidos de

longitud. Se apreciará que en ciertas realizaciones, los fragmentos tienen una longitud de al menos 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 ó 450 aminoácidos. Fragmentos polipeptídicos particularmente útiles incluyen dominios funcionales, incluidos dominios de unión. En el caso de un anticuerpo anti-IL-1-R1, fragmentos útiles incluyen, pero no se limitan a: una región CDR, especialmente una región CDR3 de la cadena pesada o ligera; un dominio variable de una cadena pesada o ligera; una parte de una cadena de anticuerpo o sólo su región variable, incluidas dos CDRs; y similares.

La expresión "fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un fragmento polipeptídico que contiene al menos los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina. Un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la invención es capaz de unirse a un ligando, evitando la unión del ligando a su receptor, interrumpiendo la respuesta biológica que resulta de la unión del ligando al receptor, o cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente, un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la invención se une específicamente a IL-1R1.

Las expresiones "que se produce de forma natural" y "nativo" significan que los materiales biológicos (moléculas, secuencias, complejos proteicos, células y similares) a los que se aplican los términos se pueden encontrar en la naturaleza y no están manipulados por el hombre. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleotídica que está presente en un organismo (incluidos virus) que se pueden aislar de una fuente de la naturaleza y que no se ha modificado intencionadamente por el hombre es que se produce de forma natural. De igual manera, las expresiones "que se produce de forma no natural" o "no nativo" se refieren a un material que no se encuentra en la naturaleza o que se ha modificado estructuralmente o ha sido sintetizado por el hombre.

La expresión "operativamente unido" significa que los componentes a los que el término se aplica están en una relación que les permite llevar a cabo sus funciones inherentes en condiciones adecuadas. Por ejemplo, una secuencia control "operativamente unida" a una secuencia codificadora de proteína está unida a ella de modo que se consigue la expresión de la secuencia codificadora de la proteína en condiciones compatibles con la actividad transcripcional de las secuencias control.

La expresión "secuencia control" significa que la secuencia polinucleotídica objeto puede efectuar la expresión y el procesamiento de las secuencias de codificación a las que está ligada. La naturaleza de dichas secuencias control puede depender del organismo hospedador. En realizaciones particulares, las secuencias control para procariotas pueden incluir un promotor, un sitio de unión al ribosoma y secuencia de terminación de la transcripción. En otras realizaciones particulares, las secuencias control para eucariotas pueden incluir promotores que comprenden uno o una pluralidad de sitios de reconocimiento para factores de transcripción, secuencias potenciadoras de la transcripción y secuencia de terminación de la transcripción. En determinadas realizaciones, "secuencias control" pueden incluir secuencias conductoras y/o secuencias de participantes en la fusión.

El término "polinucleótido" significa polímeros de ácido nucleico de cadena sencilla o de doble cadena de al menos 10 bases de longitud. En determinadas realizaciones, los nucleótidos que comprenden el polinucleótido pueden ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Dichas modificaciones incluyen modificaciones de las bases, tales como derivados de bromouridina e inosina, modificaciones de ribosa, tales como 2',3'-didesoxirribosa, y modificaciones de los enlaces internucleotídicos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforoaniladato y fosforoamidato. El término incluye formas de cadena sencilla o de doble cadena de ADN.

El término "oligonucleótido" significa un polinucleótido que comprende una longitud de 200 bases o menos. En realizaciones preferidas, los oligonucleótidos tienen una longitud de 10 a 60 bases. En realizaciones más preferidas, los oligonucleótidos tienen una longitud de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 a 40 bases. Los oligonucleótidos pueden ser de cadena sencilla o de doble cadena, *p. ej.* para uso en la construcción de un gen mutante. Los oligonucleótidos de la invención pueden ser oligonucleótidos sentido o antisentido.

La expresión "nucleótidos que se producen de forma natural" incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. La expresión "nucleótidos modificados" incluye nucleótidos con grupos azúcar modificados o sustituidos o bases modificadas o sustituidas. La expresión "enlaces oligonucleotídicos" incluye enlaces tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforoaniladato, fosforoamidato y similares. Véase, *p. ej.*, LaPlanche *et al.* (1986), *Nucl. Acids Res.* **14**:9081; Stec *et al.* (1984), *J. Am. Chem. Soc.* **106**:6077; Stein *et al.* (1988), *Nucl. Acids Res.* **16**:3209; Zon *et al.* (1991), *Anti-Cancer Drug Design* **6**:539; Zon *et al.* (1991), *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, págs. 87-108 (F. Eckstein, comp.), Oxford University Press, Oxford Inglaterra; Stec *et al.*, patente de EE.UU. nº 5.151.510; Uhlmann y Peyman (1990), *Chemical Reviews* **90**:543

Un oligonucleótido de la invención puede incluir un marcador, incluido un radiomarcador, un marcador fluorescente, un hapteno o un marcador antigénico, para ensayos de detección.

El término "vector" significa cualquier molécula (*p. ej.*, ácido nucleico, plásmido o virus) usada para transferir la información de codificación a una célula hospedadora.

La expresión “vector de expresión” o “construcción de expresión” se refiere a un vector que es adecuado para la transformación de una célula hospedadora y contiene secuencias de ácidos nucleicos que dirigen y/o controlan (en unión con la célula hospedadora) la expresión de una o más regiones de codificación heterólogas unidas operativamente al mismo. Una construcción de expresión puede incluir, entre otros, secuencias que afectan o controlan la transcripción, la traducción y el corte y empalme del ARN, si hay intrones presentes, de una región de codificación unida operativamente a la misma.

La expresión “célula hospedadora” significa una célula que ha sido transformada, o que es capaz de ser transformada con una secuencia de ácido nucleico y, de este modo, expresa un gen de interés seleccionado. La expresión incluye la progenie de la célula parental, sea o no la progenie idéntica en cuanto a morfología o la constitución genética a la célula parental original, siempre que esté presente el gen seleccionado.

El término “transducción” significa la transferencia de genes de una bacteria a otra, normalmente mediante un fago. “Transducción” también se refiere a la adquisición y la transferencia de secuencias celulares eucarióticas por retrovirus.

El término “transfección” significa la captación de ADN extraño o exógeno por una célula y una célula ha sido “transfectada” cuando se ha introducido el ADN exógeno dentro de la membrana celular. En esta memoria se describe una serie de técnicas de transfección que son bien conocidas en la técnica. Véase, p. ej., Graham et al., 1973, *Virology* 52:456; Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Id.; Davis et al., 1986, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier; y Chu et al., 1981, *Gene* 13:197. Dichas técnicas se pueden utilizar para introducir uno o más restos de ADN exógeno en células hospedadoras adecuadas.

El término “transformación” se refiere a un cambio en las características genéticas de una célula, y una célula ha sido transformada cuando se ha modificado para que contenga ADN nuevo. Por ejemplo, una célula se transforma cuando es modificada genéticamente con respecto a su estado nativo mediante transfección, transducción u otras técnicas. Tras la transfección o la transducción, el ADN transformante puede recombinarse con el de la célula al integrarse físicamente en un cromosoma de la célula o se puede mantener de forma transitoria como elemento episomal sin replicarse o se puede replicar de forma independiente como un plásmido. Se considera que una célula se ha “transformado de forma estable” cuando el ADN transformante se replica con la división de la célula.

El término “antígeno” se refiere a una molécula o una parte de una molécula a la que es capaz de unirse un agente de unión selectivo tal como un anticuerpo y, además, puede utilizarse en un animal para producir anticuerpos capaces de unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más epítipos.

El término “epítipo” incluye cualquier determinante, preferentemente un determinante polipeptídico, capaz de unirse de forma específica a una inmunoglobulina o receptor de células T. En determinadas realizaciones, los determinantes epitópicos incluyen grupos de superficie químicamente activa de moléculas, tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo o sulfonilo y, en determinadas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que está unida por un anticuerpo. En determinadas realizaciones, se dice que un anticuerpo está unido específicamente a un antígeno cuando reconoce preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. En realizaciones preferidas, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación es menor o igual a aproximadamente 10 nM, más preferentemente cuando la constante de disociación es menor o igual a aproximadamente 100 pM, y lo más preferentemente cuando la constante de disociación es menor o igual a aproximadamente 10 pM.

El término “identidad” se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más moléculas polipeptídicas o dos o más moléculas de ácido nucleico, determinado comparando las secuencias. En la técnica, “identidad” también significa el grado de relación de la secuencia entre moléculas de ácido nucleico o polipéptidos, según sea el caso, determinado por el emparejamiento entre secuencias de dos o más nucleótidos o dos o más aminoácidos. “Identidad” mide el porcentaje de emparejamientos idénticos entre la menor de dos o más secuencias con alineaciones con hueco (si hay alguna) abordadas por un modelo matemático o programa informático particular (es decir, “algoritmos”).

El término “similitud” se usa en la técnica con respecto a un concepto relacionado; sin embargo, en contraposición con “identidad”, “similitud” se refiere a una medida de la relación que incluye tanto emparejamientos idénticos como emparejamientos de sustitución conservadora. Si dos secuencias polipeptídicas tienen, por ejemplo, 10/20 aminoácidos idénticos y el resto son todos sustituciones no conservadoras, los porcentajes de identidad y similitud sería ambos del 50 %. Si en el mismo ejemplo hay cinco posiciones más cuando existen sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad sigue siendo el 50 %, pero el porcentaje de similitud sería del 75 % (15/20). Por lo tanto, en los casos en los que hay sustituciones conservadoras, el porcentaje de similitud entre dos polipéptidos será mayor que el porcentaje de identidad entre esos dos polipéptidos.

La identidad y similitud de los ácidos nucleicos y polipéptidos relacionados se pueden calcular fácilmente mediante métodos conocidos. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a los descritos en *Computational Molecular Biology*, (Lesk, A.M. comp.), 1988, Oxford University Press, Nueva York; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, (Smith, D.W., comp.), 1993, Academic Press, Nueva York; *Computer Analysis of Sequence Data*, Parte 1, (Griffin,

A.M. y Griffin, H.G., comps.) , 1994, Humana Press, New Jersey; von Heinje, G., *Sequence Analysis in Molecular Biology*, 1987, Academic Press; *Sequence Analysis Primer*, (Gribskov, M. y Devereux, J., comps.), 1991, M. Stockton Press, Nueva York; Carillo et al., 1988, *SIAM J. Applied Math.* **48**:1073; y Durbin et al., 1998, *Biological Sequence Analysis*, Cambridge University Press.

5 Se diseñan métodos preferidos para determinar la identidad para dar la mayor coincidencia entre las secuencias sometidas a ensayo. Métodos para determinar la identidad se describen en programas informáticos disponibles para el público. Métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, entre otros, el paquete del programa GCG, incluido GAP (Devereux, J., et al., 1984, *Nucl. Acid. Res.*, **12**:387; Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.*, **215**:403-410). El programa BLASTX está públicamente disponible por el National Center for Biotechnology Information (NCBI) y otras fuentes (*BLAST Manual*, Altschul et al., NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul et al., (1990, *supra*). También se puede usar el algoritmo bien conocido de SmithWaterman para determinar la identidad.

10 Ciertos esquemas de alineación para alinear dos secuencias de aminoácidos pueden dar como resultado el apareamiento de sólo una región corta de las dos secuencias, y está región alineada pequeña puede tener una identidad de secuencia muy alta, incluso si no existe una relación significativa entre las dos secuencias de longitud completa. De acuerdo con esto, en ciertas realizaciones, el método de alineación seleccionado (programa GAP) resultará en una alineación que abarca al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido diana.

15 Por ejemplo, usando el algoritmo informático GAP (Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, WI), dos polipéptidos para los que ha de determinarse el porcentaje de identidad de secuencia se alinean para obtener el apareamiento óptimo de sus respectivos aminoácidos (el "tramo apareado", tal como se determina mediante el algoritmo) . En determinadas realizaciones, una sanción por apertura de huecos (que se calcula normalmente como tres veces la diagonal media; en la que la "diagonal media" es la media de la diagonal de la matriz de comparación que está usándose; la "diagonal" es la puntuación o número asignado a cada uno de los aminoácidos perfectos apareados mediante la matriz de comparación particular) y una sanción por extensión de huecos (que es normalmente un décimo de la sanción de apertura de huecos), así como una matriz de comparación tal como PAM 250 o BLOSUM 62 se usan junto con el algoritmo En determinadas realizaciones, el algoritmo también usa una matriz de comparación convencional (véase Dayhoff et al., 1978, *Atlas of Protein Sequence and Structure*, **5**:345-352 para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **89**:10915-10919 para la matriz de comparación BLOSUM 62).

20 En determinadas realizaciones, los parámetros para la comparación de secuencias de polipéptidos incluyen los siguientes:

35 Algoritmo: Needleman et al. (1970), *J. Mol. Biol.* **48**:443-453;
Matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff et al., (1992), *supra*;
Sanción por hueco: 12
Sanción por longitud de hueco: 4
40 Umbral de similitud: 0

El programa GAP puede ser útil con los parámetros anteriores. En determinadas realizaciones, los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros predeterminados para comparaciones de polipéptidos (junto con ausencia de sanción por huecos finales) usando el algoritmo GAP.

45 La expresión "que se produce de forma natural", tal como se utiliza para referirse a los aminoácidos, se refiere a los veinte aminoácidos convencionales. Véase *Immunology-A Synthesis*, 2ª Edición, (E.S. Golub y D. R. Gren, comps.) Sinauer Associates: Sunderland, MA (1991).

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

55 Dichos compuestos a menudo se desarrollan con la ayuda de modelación molecular computerizada. Los miméticos peptídicos que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles pueden usarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico similar. En general, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un péptido o polipéptido paradigma (es decir, un péptido o polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica deseada) , tal como un anticuerpo humano, pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace seleccionado de: -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH- (cis y trans) , -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- y -CH₂SO-, por métodos bien conocidos en la técnica. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (*p. ej.*, D-lisina en lugar de L-lisina) también puede usarse en determinadas realizaciones para generar péptidos más estables. Además, se pueden generar péptidos constreñidos que comprenden una secuencia consenso o una variación de la secuencia consenso sustancialmente idéntica mediante métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch, 1992, *Ann. Rev. Biochem.* **61**:387; por ejemplo, mediante la adición de residuos internos de cisteína capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

65

“Anticuerpo” o “péptido(s) de anticuerpo(s)” se refiere a un anticuerpo intacto o a un fragmento de unión del mismo que compite con el anticuerpo intacto para la unión específica e incluye anticuerpos biespecíficos quiméricos, humanizados y completamente humanos. En determinadas realizaciones, los fragmentos de unión se producen mediante técnicas de ADN recombinante. En realizaciones adicionales, los fragmentos de unión se producen mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen, pero no se limitan a Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y anticuerpos de cadena sencilla.

La expresión “cadena pesada” incluye una cadena pesada de longitud completa y fragmentos de la misma que tienen una secuencia de la región variable suficiente para conferir especificidad para IL-1R1. Una cadena pesada de longitud completa incluye un dominio de región variable, V_H, y tres dominios de la región constante, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. El dominio V_H está en el extremo amino del polipéptido y el dominio C_{H3} está en el extremo carboxilo.

La expresión “cadena ligera” incluye una cadena ligera de longitud completa y fragmentos de la misma que tienen una secuencia de la región variable suficiente para conferir especificidad para IL-1R1. Una cadena ligera de longitud completa incluye un dominio de la región variable, V_L, y un dominio de la región constante, C_L. Al igual que la cadena pesada, el dominio de la región variable de la cadena ligera está en el extremo amino del polipéptido.

Un “fragmento Fab” está compuesto por una cadena ligera y las regiones C_{H1} y variable de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de la cadena pesada. Un “fragmento Fab” contiene una cadena ligera y una cadena pesada que contiene más de la región constante, entre los dominios C_{H1} y C_{H2}, de modo que se puede formar un enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas para formar una molécula F(ab')₂.

Un “fragmento F(ab')₂” contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una parte de la región constante entre los dominios C_{H1} y C_{H2}, de modo que se puede formar un enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas.

La “región Fv” comprende las regiones variables de las cadenas tanto pesada como ligera, pero carece de las regiones constantes.

“Anticuerpos de cadena sencilla” son moléculas Fv en las que las regiones variables de la cadena pesada y ligera se han conectado mediante un enlazador flexible para formar una cadena polipeptídica sencilla, que forma una región de unión a antígeno. Los anticuerpos de cadena sencilla se comentan con detalle en la publicación de solicitud de patente internacional n° WO 88/01649 y las patentes de EE.UU. n°s 4.946.778 y 5.260.203.

Se entiende que un “anticuerpo bivalente” aparte de un anticuerpo “multiespecífico” o “multifuncional”, en determinadas realizaciones, comprende sitios de unión que tienen idéntica especificidad antigénica.

Un anticuerpo “biespecífico” o “bifuncional” es un anticuerpo híbrido que tiene dos pares de cadena pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante diversos métodos, incluidos, pero no limitados a fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Véase, *p. ej.*, Songsivilai y Lachmann (1990), *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321; Kostelny et al. (1992), *J. Immunol.* 148:1547-1553.

Al evaluar la unión y especificidad del anticuerpo de acuerdo con la invención, un anticuerpo “inhibe sustancialmente” la adhesión de un ligando a un receptor cuando un exceso de anticuerpo reduce la cantidad de receptor unido al contrarreceptor en al menos aproximadamente 20%, 40%, 60%, 80%, 85% o más (medido en un ensayo de unión competitiva *in vitro*).

El término “agente” significa un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto hecho de materiales biológicos.

Los términos “marcador” o “marcado” se refiere a la incorporación de un marcador detectable, *p. ej.* mediante incorporación de un aminoácido radiomarcado o la fijación a un polipéptido de restos de biotina que se pueden detectar mediante avidina marcada (*p. ej.*, estreptavidina que, preferiblemente, comprende un marcador detectable tal como un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente o una actividad enzimática que se puede detectar mediante procedimientos ópticos o colorimétricos). En determinadas realizaciones, el marcador también puede ser terapéutico. En la técnica se conocen diversos métodos de marcaje de polipéptidos y glicoproteínas y se pueden usar de forma ventajosa en los métodos descritos en esta memoria. Ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (*p. ej.*, ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ^{99m}Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I), marcadores fluorescentes (*p. ej.*, isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, fósforos lantánidos), marcadores enzimáticos (*p. ej.*, peroxidasa de rábano picante, β-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, marcadores de hapteno tales como grupos biotinilo y epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un informador secundario (*p. ej.*, pares de secuencias en cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, etiquetas del epítopo). En determinadas realizaciones, los marcadores están unidos por brazos espaciadores (tales como (CH₂)_n, en donde n < aproximadamente 20) de diversas longitudes para reducir el potencial impedimento estérico.

La expresión “muestra biológica” incluye, pero no se limita a cualquier cantidad de una sustancia de algo vivo o algo antes vivo. Dichos algos vivos incluyen, pero no se limitan a seres humanos, ratones, monos, ratas, conejos y otros animales. Dichas sustancias incluyen, pero no se limitan a sangre, suero, orina, células, órganos, tejidos, hueso, médula ósea, linfa, ganglios linfáticos, tejido sinovial, condrocitos, macrófagos sinoviales, células endoteliales, tejido vascular (tejido vascular particularmente inflamado) y piel. Las expresiones “agente farmacéutico” y “fármaco” se refieren a un compuesto o composición química capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra adecuadamente a un paciente.

El término “paciente” incluye sujetos humanos y veterinarios.

A menos que el contexto requiera lo contrario, los términos en singular incluyen el plural y los términos en plural incluirán el singular.

15 Aminoácidos

Los veinte aminoácidos naturales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase *Immunology -A Synthesis*, 2ª Edición, (E.S. Golub y D. R. Gren, comps.) Sinauer Associates: Sunderland, MA (1991). Estereoisómeros (*p. ej.*, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como aminoácidos α,α -disustituídos, N-alquilaminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos de esta invención. Ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (*p. ej.*, 4-hidroxiprolina). En la notación polipeptídica usada en esta memoria, la dirección izquierda es la dirección amino-terminal y la dirección derecha es la dirección carboxilo-terminal, de acuerdo con el uso estándar y la convención.

De forma similar, a menos que se especifique de otro modo, el extremo izquierdo de las secuencias de polinucleótidos monocatenarias es el extremo 5'; la dirección izquierda de las secuencias de polinucleótidos de doble cadena se denomina la dirección 5'. La dirección de adición de 5' a 3' de los transcritos de ARN naciente se denomina la dirección de transcripción; las regiones de la secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ADN y son 5' al extremo 5' del transcrito de ARN se denominan “secuencias aguas arriba”; las regiones de la secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el transcrito de ARN que están en 3' del extremo 3' del transcrito de ARN se denominan “secuencias aguas abajo”.

Se apreciará que los residuos de aminoácidos que se producen de forma natural pueden dividirse en clases basándose en propiedades de cadena lateral comunes:

- 1) hidrófobos: norleucina (Nor o Nle), Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 3) de carácter ácido: Asp, Glu;
- 4) de carácter básico: His, Lys, Arg;
- 5) residuos que influyen en la orientación de las cadenas: Gly, Pro; y
- 6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones de aminoácidos conservadoras pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases con otro miembro de la misma clase. Sustituciones de aminoácidos conservadoras pueden abarcar residuos de aminoácidos que no se producen de forma natural, que típicamente se incorporan mediante síntesis peptídica química en lugar de síntesis en sistemas biológicos. Estas incluyen peptidomiméticos y otras formas reversas o invertidas de restos aminoácidos.

Las sustituciones no conservadoras pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases con un miembro de otra clase. Dichos residuos sustituidos se pueden introducir, *por ejemplo*, en regiones de un anticuerpo humano que son homólogas con los anticuerpos no humanos o en las regiones no homólogas de la molécula.

Al realizar dichos cambios, de acuerdo con determinadas realizaciones, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. A cada uno de los aminoácidos se le ha asignado un índice hidropático sobre la base de su hidrofobicidad y características de carga. Éstos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

En la técnica se entiende la importancia del índice hidropático de los aminoácidos al conferir la función biológica interactiva sobre una proteína (*véase, por ejemplo*, Kyte *et al.*, 1982, *J. Mol. Biol.*, 157:105-131). Se sabe que determinados aminoácidos se pueden sustituir con otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropática similar y siguen conservando una actividad biológica similar. Al realizar cambios en base al índice hidropático, en ciertas realizaciones se puede incluir la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están en ± 2 . En determinadas realizaciones, se incluyen los que están dentro de ± 1 , y en determinadas realizaciones, están incluidos aquéllos dentro de $\pm 0, 5$.

También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares se puede realizar de forma eficaz sobre la base de la hidrofili­cidad, particularmente cuando la proteína o péptido biológicamente funcional creado de este modo está destinado al uso en realizaciones inmunológicas, tal como se describe en esta memoria. En determinadas realizaciones, la hidrofili­cidad media local mayor de una proteína está gobernada por la hidrofili­cidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es *decir*, con una propiedad biológica de la proteína.

A estos residuos de aminoácidos se les ha asignado los siguientes valores de hidrofili­cidad: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 ± 1); glutamato (+3,0 ± 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 ± 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4) . Al realizar cambios en base a valores de hidrofili­cidad similares, en determinadas realizaciones se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofili­cidad están dentro de ± 2, en determinadas realizaciones se incluyen los que están dentro de ±1 y en determinadas realizaciones se incluyen aquéllos dentro de ± 0,5. También se pueden identificar epítomos de secuencias de aminoácidos primarias sobre la base de la hidrofili­cidad. A estas regiones también se las alude como "regiones del núcleo epitópicas".

Sustituciones de aminoácidos ilustrativas se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1

Sustituciones de aminoácidos

Residuos originales	Sustituciones Ilustrativas	Sustituciones Preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala Phe	Ile
Lys	Arg, ácido 1,4-diaminobutírico, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, norleucina	Leu

Un experto en la técnica podrá determinar variantes adecuadas de los polipéptidos, tal como se recoge en esta memoria, usando técnicas bien conocidas. En determinadas realizaciones, un experto en la técnica puede identificar zonas adecuadas de la molécula que se pueden cambiar sin destruir la actividad dirigiendo a regiones que no se cree que sean importantes para la actividad. En otras realizaciones, el experto en la técnica puede identificar residuos y porciones de las moléculas que están conservados entre polipéptidos similares. En realizaciones adicionales, incluso las zonas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden estar sujetas a sustituciones conservadoras de aminoácidos sin destruir la actividad biológica o sin afectar de forma adversa a la estructura del polipéptido.

Adicionalmente, un experto en la técnica puede revisar estudios de estructura-función identificando residuos en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o la estructura. A la vista de esta comparación, el experto en la técnica puede predecir la importancia de los residuos de aminoácidos en una proteína que corresponden a los residuos de aminoácidos que son importantes para la actividad o la estructura en proteínas similares. Un experto en la técnica puede optar por sustituciones de aminoácidos químicamente similares para dichos residuos de aminoácidos importantes predichos.

Un experto en la técnica también puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con esa estructura en polipéptidos similares. A la vista de tal información, un experto en la técnica puede predecir la alineación de restos de aminoácidos de un anticuerpo con respecto a su estructura tridimensional. En determinadas

realizaciones, un experto en la técnica puede elegir no realizar cambios en los radicales en los residuos de aminoácidos predichos que están sobre la superficie de la proteína, ya que tales residuos pueden estar implicados en interacciones importantes con otras moléculas. Además, un experto en la técnica puede generar variantes de ensayo que contienen una sola sustitución de aminoácido en cada residuo de aminoácido deseado. Las variantes se pueden seleccionar después usando ensayos de actividad conocidos por los expertos en la técnica. Tales variantes se pueden usar para acumular información sobre variantes adecuadas. Por ejemplo, si se descubre que un cambio en un residuo de aminoácido particular dio como resultado la destrucción, reducción de manera no deseada, o no adecuada, de la actividad, las variantes con tal cambio se podrían evitar. En otras palabras, basándose en la información acumulada a partir de tales experimentos rutinarios, un experto en la técnica puede fácilmente determinar los aminoácidos en los que se deben evitar las sustituciones, bien solas o en combinación con otras mutaciones.

Se ha dedicado un cierto número de publicaciones científicas a la predicción de la estructura secundaria. Véase Moulton, 1996, *Curr. Op. in Biotech.* 7:422-427; Chou et al., 1974, *Biochemistry* 13:222-245; Chou et al., 1974, *Biochemistry* 113:211-222; Chou et al., 1978, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47:45-148; Chou et al., 1979, *Ann. Rev. Biochem.* 47:251-276; y Chou et al., 1979, *Biophys. J.* 26:367-384. Además, actualmente se dispone de programas informáticos que ayudarán a predecir la estructura secundaria. Un método de predicción de la estructura secundaria se basa en la modelación de homología. Por ejemplo, dos polipéptidos o proteínas que tienen una identidad de secuencia de más de 30%, o una similitud mayor que 40% a menudo tienen topologías estructurales similares. El crecimiento reciente de la base de datos estructural de la proteína (PDB) ha proporcionado una capacidad de predicción potenciada de la estructura secundaria, incluyendo el número potencial de plegamientos dentro de una estructura de polipéptido o proteína. Véase Holm et al., 1999, *Nucl. Acid. Res.* 27:244-247. Se ha sugerido (Brenner et al., 1997, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 7: 369 -376) que existe un número limitado de plegamientos en un polipéptido o proteína dados y que una vez que se ha resuelto un número crítico de estructuras, la predicción estructural llegará a ser drásticamente más precisa.

Métodos adicionales de predicción de la estructura secundaria incluyen el "enhebrado" (Jones, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:377-87; Sippl et al., 1996, *Structure* 4:15-19); el "análisis del perfil" (Bowie et al., 1991, *Science* 253:164-170; Gribskov et al., 1990, *Meth. Enzym.* 183:146-159; Gribskov et al., 1987, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84:4355-4358) y el "enlace de evolución" (véase Holm, 1999, *supra*; y Brenner, 1997, *supra*).

En determinadas realizaciones, variantes de anticuerpos incluyen variantes de glicosilación en donde el número y/o tipo del sitio de glicosilación ha sido alterado en comparación con las secuencias de aminoácidos del polipéptido parental. En determinadas realizaciones, las variantes de proteínas incluyen un número mayor o menor de sitios de glicosilación unidos por N que la proteína nativa. Un sitio de glicosilación unido a N se caracteriza por la secuencia: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en donde el residuo de aminoácido designado como X puede ser cualquier residuo de aminoácido excepto prolina. La sustitución de residuos de aminoácidos para crear esta secuencia proporciona un potencial sitio nuevo para la adición de una cadena de hidratos de carbono unida a N. Alternativamente, las sustituciones que eliminan esta secuencia separarán una cadena de hidrato de carbono unida a N existente. También se proporciona una reorganización de cadenas de hidratos de carbono unidas a N, en donde se eliminan uno o más sitios de glicosilación unidos a N (típicamente aquéllos que se producen de manera natural) y se crean uno o más sitios unidos a N nuevos. Variantes de anticuerpos adicionales preferidas incluyen variantes de cisteína en donde uno o más residuos cisteína se suprimen o sustituyen por otro aminoácido (p. ej., serina) en comparación con la secuencia de aminoácidos parental. Variantes de cisteína pueden ser útiles cuando los anticuerpos se deben volver a plegar en una conformación biológicamente activa, tal como después del aislamiento de cuerpos de inclusión insolubles. En general, las variantes de cisteína tienen menos residuos cisteína que la proteína nativa y normalmente tienen un número par para minimizar las interacciones que resultan de cisteínas no apareadas.

De acuerdo con determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son aquéllas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos proteicos, (4) alteran las afinidades de unión y/o (5) confieren o modifican otras propiedades físico-químicas o funcionales de dichos polipéptidos. De acuerdo con determinadas realizaciones, las sustituciones sencillas o múltiples de aminoácidos (en determinadas realizaciones, sustituciones conservadoras de aminoácidos) pueden realizarse en la secuencia que se produce de forma natural (en determinadas realizaciones en la porción del polipéptido fuera del o de los dominios que forman contactos intermoleculares). En realizaciones preferidas, una sustitución conservadora de aminoácido normalmente no cambia sustancialmente las características estructurales de la secuencia parental (p. ej., un reemplazo de aminoácido no debería tender a romper una hélice que se encuentre en la secuencia parental o alterar otros tipos de estructura secundaria que caracteriza la secuencia parental). Ejemplos de estructuras polipeptídicas secundarias y terciarias reconocidas en la técnica se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, comp.) 1984, W. H. Freeman and Company, Nueva York; *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, comps.), 1991, Garland Publishing, Nueva York, N.Y.; y Thornton et al. (1991), *Nature* 354:105.

Preparación de Anticuerpos

Las unidades estructurales de los anticuerpos que se producen de forma natural comprenden típicamente un tetrámero. Cada uno de estos tetrámeros normalmente está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada uno de los pares una cadena "ligera" de longitud completa (típicamente de un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" de longitud completa (típicamente de un peso molecular de

aproximadamente 50-70 kDa). La parte amino-terminal de cada una de las cadenas incluye típicamente una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que típicamente es la responsable del reconocimiento del antígeno. La parte carboxi-terminal de cada una de las cadenas define una región constante responsable de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican típicamente como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican típicamente como mu, delta, gamma, alfa o epsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. La IgG tiene varias subclases, incluidas, entre otras, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La IgM tiene subclases, incluidas, pero no limitadas a IgM1 e IgM2. La IgA se subdivide de forma similar en subclases, incluidas, pero no limitadas a IgA1 e IgA2. Dentro de las cadenas ligera y pesada de longitud completa, típicamente una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos une la región variable y las regiones constantes, incluyendo la cadena pesada también una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase, p. ej., *Fundamental Immunology*, Capítulo. 7, 2ª ed., (Paul, W., comp.), 1989, Raven Press, N.Y.

La combinación de las regiones variables de cada uno de los pares de cadena ligera/cadena pesada típicamente forma el sitio de unión a antígeno.

Las regiones variables de cada una de las cadenas pesadas y cadenas ligeras típicamente exhiben la misma estructura general que comprende cuatro regiones de armazón (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de la complementariedad o CDRs. Las CDRs de las dos cadenas de cada uno de los pares normalmente están alineadas por las regiones de armazón, alineación que puede permitir la unión a un epítipo específico. Del extremo N al extremo C, las regiones variables tanto de las cadenas ligeras como de las pesadas comprenden típicamente los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada uno de los dominios se realiza típicamente de acuerdo con las definiciones de *Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest* (1987 y 1991, National Institutes of Health, Bethesda, Md), Chothia y Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917, o Chothia *et al.*, 1989, *Nature* 342:878-883).

Los anticuerpos pasaron a ser útiles y de interés como agentes farmacéuticos con el desarrollo de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se producen utilizando cualquier método que produzca moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Ejemplos de métodos adecuados para preparar anticuerpos monoclonales incluyen los métodos de hibridoma de Kohler *et al.* (1975, *Nature* 256:495-497) y el método de hibridoma de células B humanas (Kozbor, 1984, *J. Immunol.* 133:3001; y Brodeur *et al.*, 1987, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, (Marcel Dekker, Inc., Nueva York), págs. 51-63).

Los anticuerpos monoclonales se pueden modificar para uso como productos terapéuticos. Un ejemplo es un anticuerpo "quimérico" en el que una parte de la cadena pesada y/o la cadena ligera es idéntica u homóloga a una correspondiente secuencia en anticuerpos derivados de una especie particular o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la o las cadenas son idénticas u homólogas a una secuencia correspondiente en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos. Otros ejemplos son fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada. Véase, la patente de EE.UU. n.º 4.816.567; y Morrison *et al.* (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855. Un desarrollo relacionado es el anticuerpo "injertado en CDR", en el que el anticuerpo comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de una especie particular o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la o las cadenas son idénticas u homólogas a una secuencia correspondiente en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos.

Otro desarrollo es el anticuerpo "humanizado". En la técnica se conocen bien métodos para humanizar anticuerpos no humanos. (Véanse las patentes de EE.UU. n.º 5.585.089 y 5.693.762). En general, un anticuerpo humanizado se produce en un animal no humano y, después, determinados residuos de aminoácidos, típicamente de porciones que no reconocen antígenos del anticuerpo, se modifican para que sean homólogos a dichos residuos en un anticuerpo humano del isotipo correspondiente. La humanización se puede realizar, por ejemplo, usando métodos descritos en la técnica (Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332:323-327; Verhoeyen *et al.*, 1988, *Science* 239:1534-1536), sustituyendo al menos una parte de una región variable de roedor para las regiones correspondientes de un anticuerpo humano.

Más reciente y más prometedor es el desarrollo de anticuerpos humanos sin exposición del antígeno al ser humano ("anticuerpos completamente humanos"). Usando animales transgénicos (p. ej., ratones) que son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de la producción endógena de inmunoglobulina de ratón, dichos anticuerpos se producen mediante inmunización con un antígeno (que típicamente tiene al menos 6 aminoácidos contiguos), opcionalmente conjugado con un vehículo. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551-2555; Jakobovits *et al.*, 1993, *Nature* 362:255-258; y Bruggermann *et al.*, 1993, *Year in Immunol.* 7:33. En un ejemplo de estos métodos, los animales transgénicos se producen incapacitando los loci de inmunoglobulina de ratón endógena que codifica las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina de ratón e insertando los loci que codifican las proteínas de las cadenas pesada y ligera humanas en el genoma del mismo. Animales parcialmente modificados, que tienen menos que el complemento completo de modificaciones, se cruzan luego para obtener un animal que tenga todas las modificaciones deseadas del sistema inmune. Cuando se administra un inmunógeno, estos animales transgénicos producen anticuerpos que son inmunoespecíficos para estos antígenos que tienen secuencias de aminoácidos humanas (en lugar de murinas), incluidas las regiones variables. Véanse las

publicaciones PCT n°s W096/33735 y W094/02602. Métodos adicionales se describen en la patente de EE.UU. n° 5.545.807, las publicaciones PCT n°s W091/10741, W090/04036, y en los documentos EP 546073B1 y EP 546073A1. Los anticuerpos humanos también se pueden producir mediante la expresión de ADN recombinante en células hospedadoras o mediante la expresión en células de hibridoma, tal como se describe en esta memoria.

Anticuerpos completamente humanos también se pueden producir a partir de bancos de expresión en fagos (como se describe en Hoogenboom *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; y Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581). Estos procesos simulan la selección inmunitaria a través de la expresión de repertorios de anticuerpos sobre la superficie de bacteriófagos filamentosos y la subsiguiente selección de fagos mediante su unión a un antígeno de elección. Una de estas técnicas se describe en la publicación PCT n° W099/10494, que describe el aislamiento de anticuerpos de alta afinidad y agonistas funcionales para receptores de MPL y msk, usando dicha estrategia.

Una vez que se han determinado las secuencias de nucleótidos que codifican dichos anticuerpos, los anticuerpos quiméricos, injertados en CDR, humanizados y completamente humanos también se pueden producir mediante métodos recombinantes. Los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos se introducen en células hospedadoras y se expresan usando materiales y procedimientos generalmente conocidos en la técnica.

La invención proporciona uno o una pluralidad de anticuerpos monoclonales completamente humanos contra IL-1R1 humano. Preferiblemente, los anticuerpos se unen al tercer dominio de IL-1R1. En realizaciones preferidas, la invención proporciona secuencias de nucleótidos que codifican, y secuencias de aminoácidos que comprenden moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera, en particular secuencias que corresponden a las regiones variables de las mismas. En realizaciones preferidas, se proporcionan las secuencias correspondientes a las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs), específicamente de CDR1 a CDR3. En realizaciones adicionales preferidas, la invención proporciona líneas celulares de hibridoma que expresan dichas moléculas de inmunoglobulina y anticuerpos monoclonales producidos a partir de ellas, más preferentemente anticuerpos monoclonales humanos purificados contra IL-1R1 humano.

La capacidad para clonar y reconstruir loci humanos de tamaño de megabases en cromosomas artificiales de levadura (YACs) y para introducirlos en la línea germinal de ratón proporciona una estrategia ventajosa para elucidar los componentes funcionales de loci muy grandes representados en mapa, así como generar modelos útiles de enfermedad humana. Además, la utilización de esta tecnología para sustituir los loci de ratón con sus equivalentes humanos proporciona información única sobre la expresión y regulación de productos génicos humanos durante el desarrollo, su comunicación con otros sistemas, y su implicación en la inducción y progresión de la enfermedad.

Una aplicación práctica importante de dicha estrategia es la "humanización" del sistema inmunitario humoral de ratón. La introducción de loci de inmunoglobulina (Ig) humana en ratones en los que los genes de Ig endógena se han inactivado ofrece la oportunidad de estudiar los mecanismos subyacentes a la expresión programada y el ensamblaje de los anticuerpos, así como su papel en el desarrollo de células B. Además, dicha estrategia proporciona una fuente para la producción de anticuerpos monoclonales (MAbs – siglas en inglés) humanos, particularmente para uso como agentes terapéuticos. Cabe esperar que los anticuerpos completamente humanos minimicen las respuestas inmunogénicas y alérgicas intrínsecas a MAbs de ratón o derivados de ratón y, de este modo, que incrementen la eficacia y la seguridad de los anticuerpos administrados en aplicaciones terapéuticas. Los anticuerpos completamente humanos se pueden usar en el tratamiento de enfermedades humanas crónicas y recurrentes, tales como osteoartritis, artritis reumatoide y otras afecciones inflamatorias, requiriendo el tratamiento de las mismas la administración repetida de anticuerpos.

Un experto en la técnica puede tratar mediante ingeniería genética cepas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón con fragmentos grandes de los loci de Ig humana, de modo que dichos ratones producen anticuerpos humanos en ausencia de anticuerpos de ratón. Los fragmentos grandes de Ig humana pueden conservar la gran diversidad de genes variables, así como la regulación adecuada de producción y expresión de anticuerpos. Explotando la maquinaria del ratón para diversificar y seleccionar anticuerpos y la falta de tolerancia inmunológica a proteínas humanas, el repertorio de anticuerpos humanos reproducidos en estas cepas de ratón da anticuerpos de alta afinidad contra cualquier antígeno de interés, incluidos antígenos humanos. Usando la tecnología del hibridoma, se pueden producir y seleccionar MAbs humanos específicos de antígeno con la especificidad deseada.

En determinadas realizaciones, el experto en la técnica puede usar regiones constantes de especies distintas a la humana junto con la o las regiones variables humanas en dichos ratones para producir anticuerpos quiméricos. Los anticuerpos de la invención se pueden producir inmunizando dichos animales con IL-1R1 de longitud completa, formas solubles de IL-1R1, o un fragmento del mismo. Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional WO 93/12227).

Las CDRs de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos anti-IL-1R1 de la invención se pueden injertar en las regiones de armazón (FRs) de la misma, u otra, especie. En ciertas realizaciones, las CDRs de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de anticuerpos anti-IL-1R1 se pueden injertar en FRs humanas consenso. Para crear FRs humanas consenso, las FRs de varias secuencias de aminoácidos de la cadena pesada o la cadena ligera humanas se alinean para identificar una secuencia de aminoácidos consenso. Las FRs de la cadena

pesada o la cadena ligera del anticuerpo anti-IL-1R1 se pueden reemplazar por las FRs de una cadena pesada o cadena ligera diferente. Los aminoácidos raros en las FRs de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-IL-1R1 típicamente no se reemplazan, mientras que el resto de los aminoácidos de la FR se pueden reemplazar. Los aminoácidos raros son aminoácidos específicos que están en posiciones en las que normalmente no se encuentran en las FRs. Las regiones variables injertadas de anticuerpos anti-IL-1R1 de la invención se pueden usar con una región constante que es diferente de la región constante del anticuerpo anti-IL-1R1. Alternativamente, las regiones variables injertadas son parte de un anticuerpo Fv de cadena sencilla. El injerto de CDR se describe, *p. e.j.*, en las patentes de EE.UU. n°s 6.180.370, 5.693.762, 5.693.761, 5.585.089 y 5.530.101 .

En determinadas realizaciones, la invención proporciona anticuerpos anti-IL1-R1 que comprenden una región CDR1 de la cadena pesada humana que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61; SEQ ID NO: 62 o SEQ ID NO: 63; una región CDR2 de la cadena pesada humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64; SEQ ID NO: 65 o SEQ ID NO: 66; y/o una región CDR3 de la cadena pesada humana que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67; SEQ ID NO: 68 o SEQ ID NO: 69.

En otras realizaciones, la invención proporciona anticuerpos anti-IL1-R1 que comprenden una región CDR1 de la cadena ligera humana que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 o SEQ ID NO: 71; una región CDR2 de la cadena ligera humana que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72 o SEQ ID NO: 73; y/o una región CDR3 de la cadena ligera humana que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74 o SEQ ID NO: 75.

Los anticuerpos de la invención se preparan, preferiblemente, utilizando ratones transgénicos que tienen una parte sustancial del locus productor de anticuerpos humanos insertado en células productoras de anticuerpos de los ratones y que, además, se someten a ingeniería para que sean deficientes en la producción de anticuerpos murinos endógenos. Dichos ratones son capaces de producir moléculas de inmunoglobulina humana y anticuerpos humanos, y no producen o producen cantidades sustancialmente reducidas de moléculas de inmunoglobulina y anticuerpos murinos. Las tecnologías utilizadas para alcanzar este resultado se describen en las patentes, solicitudes y referencias descritas en esta memoria descriptiva. En realizaciones preferidas, el trabajador experto puede emplear métodos tales como los descritos en la publicación de la solicitud de patente internacional n° WO 98/24893, que se incorpora con ello como referencia para cualquier fin. Véase también Mendez *et al.*, 1997, *Nature Genetics* 15:146-156.

Los anticuerpos monoclonales (MAbs) de la invención se pueden producir mediante una diversidad de técnicas, incluida la metodología convencional de anticuerpos monoclonales, *p. ej.* la técnica de hibridación de células somáticas estándar de Kohler y Milstein, 1975, *Nature* 256:495. Aunque se prefieren los procesos de hibridación de células somáticas, en principio se pueden utilizar otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, *p. ej.* transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

En una realización preferida, los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra IL-1R1 se pueden generar utilizando ratones denominados ratones "HuMab", contienen un minilocus del gen de inmunoglobulina humana que codifica las secuencias de inmunoglobulina de la cadena pesada (μ y γ) y la cadena ligera κ , junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de las cadenas μ y κ . Lonberg *et al.*, 1994, *Nature* 368:856-859. Por consiguiente, los ratones exhiben una expresión reducida de IgM de ratón o κ y, en respuesta a la inmunización, los transgenes de la cadena pesada y ligera humanas sufren conmutación de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG κ humana de alta afinidad. Lonberg *et al.*, *supra*; Lonberg y Huszar, 1995, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93; Harding y Lonberg, 1995, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546. La preparación de ratones HuMab se describe con detalle en Taylor *et al.*, 1992, *Nucleic Acids Res.* 20: 6287-6295; Chen *et al.*, 1993, *International Immunology* 5:647-656; Tuaille *et al.*, 1994, *J. Immunol.* 152:2912-2920; Lonberg *et al.*, 1994, *Nature* 368:856-859; Lonberg, 1994, *Handbook of Exp. Pharmacology* 113:49-101; Taylor *et al.*, 1994, *International Immunology* 6:579-591; Lonberg y Huszar, 1995, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93; Harding y Lonberg, 1995, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546; Fishwild *et al.*, 1996, *Nature Biotechnology* 14:845-851, cuyos todos contenidos se incorporan con ello como referencia en su totalidad. Véanse, además, las patentes de EE.UU. n° 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661. 016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas expedidas a Lonberg y Kay, así como la patente de EE.UU. n° 5.545.807 expedida a Surani *et al.*; las publicaciones de solicitud de patente internacional n° WO 93/1227, publicada el 24 de junio de 1993; el documento WO 92/22646, publicado el 23 de diciembre de 1992; y el documento WO 92/03918, publicado el 19 de marzo de 1992.

Aternativamente, las cepas de ratones transgénicos HCo7 y HCo12 descritos en los Ejemplos siguientes se pueden usar para generar anticuerpos anti-IL-1R1 humanos.

Ventajosamente, los anticuerpos monoclonales completamente humanos específicos de IL-1R1 se producen del siguiente modo. Los ratones transgénicos que contienen genes de inmunoglobulina humana se inmunizan con el antígeno relacionado con IL-1R1 de interés. Se obtienen células linfáticas (tales como células B) de los ratones que expresan anticuerpos. Dichas células recuperadas se fusionan con una línea celular de tipo mieloide para preparar líneas celulares de hibridoma inmortales y dichas líneas celulares de hibridoma se rastrean y se seleccionan para identificar líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos específicos para el antígeno de interés. En determinadas realizaciones, se proporciona la producción de una línea celular de hibridoma que produce anticuerpos

específicos para IL-1R1.

En realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención son producidos por líneas de hibridoma. En estas realizaciones, los anticuerpos de la invención se unen a IL-1R1 con una constante de disociación (K_d) de entre aproximadamente 4 pM y 100 pM. En determinadas realizaciones de la invención, los anticuerpos se unen a IL-1R1 con una K_d inferior a aproximadamente 20 pM. En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención se unen al tercer dominio de IL-1R1. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del tercer dominio de IL-1R1 humano y de rata se muestran en la Figura 17.

En realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención son del isotipo IgG1, IgG2 o IgG4, siendo el isotipo IgG2 el más preferido. En realizaciones preferidas de la invención, los anticuerpos comprenden una cadena ligera kappa humana y una cadena pesada de IgG 1, IgG2 o IgG4. En realizaciones particulares, las regiones variables de los anticuerpos están ligadas a una región constante distinta a la región constante del isotipo IgG1, IgG2 o IgG4. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la invención se han clonado para expresión en células de mamífero.

En determinadas realizaciones, las sustituciones conservadoras de aminoácidos en las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-IL-1R1 (y las correspondientes modificaciones en los nucleótidos codificadores) producirán anticuerpos anti-IL-1R1 que tienen características funcionales y químicas similares a las del anticuerpo anti-IL-1R1. En contraste con esto se pueden realizar modificaciones sustanciales en las características funcionales y/o químicas del anticuerpo anti-IL-1R1 seleccionando sustituciones en la secuencia de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento (a) de la estructura del almacén molecular en la zona de la sustitución, por ejemplo como una conformación en lámina o en hélice, (b) de la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) del grosor de la cadena lateral.

Por ejemplo, una "sustitución de aminoácidos conservadora" puede implicar una sustitución de un residuo de aminoácido nativo con un residuo no nativo, de modo que haya poco o ningún efecto sobre la polaridad o la carga del residuo aminoácido en dicha posición. Además, cualquier residuo nativo en el polipéptido se puede sustituir también con alanina, como se ha descrito anteriormente para "mutagénesis de rastreo de alanina" (Wells, 1991, *Methods Enzymol.* 202:390 (comp. J.J. Langone), Academic Press, Londres).

Los expertos en la técnica pueden determinar sustituciones de aminoácidos deseadas (conservativas o no conservativas) en el momento en el que se deseen dichas sustituciones. En ciertas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos se pueden usar para identificar residuos importantes de anticuerpos anti-IL-1R1 o incrementar o disminuir la afinidad de los anticuerpos anti-IL-1R1 descritos en esta memoria.

En realizaciones alternativas, los anticuerpos de la invención se pueden expresar en líneas celulares distintas a las líneas celulares de hibridoma. En estas realizaciones, se pueden usar las secuencias que codifican anticuerpos particulares para la transformación de una célula hospedadora de mamífero adecuada. De acuerdo con estas realizaciones, la transformación se puede conseguir usando cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula hospedadora, incluidos, por ejemplo, empaquetado del polinucleótido en un virus (o en un vector viral) y transducción de una célula hospedadora con el virus (o vector) o mediante procesos de transfección conocidos en la técnica. Dichos procesos se ejemplifican en las patentes de EE.UU. nº 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455. En general, el proceso de transformación usado puede depender del hospedante que se ha de transformar. En la técnica se conocen bien métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero e incluyen, pero no se limitan a transfección mediada por dextrano, precipitación en fosfato cálcico, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del o de los polinucleótidos en liposomas y microinyección directa del ADN en los núcleos.

De acuerdo con determinadas realizaciones de los métodos de la invención, una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena pesada, una región variable de la cadena pesada, una región constante de la cadena ligera o una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo anti-IL-1R1 de la invención se inserta en un vector de expresión adecuado utilizando técnicas de unión convencionales. En una realización preferida, la región constante de la cadena pesada o ligera de IL-1R1 se une al extremo C de la región variable apropiada y se liga en un vector de expresión. Normalmente, el vector se selecciona de modo que sea funcional en la célula hospedadora concreta empleada (es decir, el vector es compatible con la maquinaria de la célula hospedadora de un modo tal que se puede producir la amplificación del gen y/o la expresión del gen). Para una revisión de los vectores de expresión, véase Goeddel (comp.), 1990, *Meth. Enzymol.* Vol. 185, Academic Press. N.Y.

Típicamente, los vectores de expresión utilizados en cualquiera de las células hospedadoras contendrán secuencias para el mantenimiento de plásmidos y para la clonación y expresión de secuencias de nucleótidos exógenas. Dichas secuencias, a las que se alude colectivamente como "secuencias flanqueantes" en determinadas realizaciones, incluirán típicamente una o más de las siguientes secuencias de nucleótidos: un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación de la transcripción, una secuencia de intrón completa que contiene un sitio de corte y empalme donante y aceptor, una secuencia que codifica una secuencia conductora para la secreción de polipéptidos, un sitio de unión a ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región de polienlazador para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido que se ha de expresar y un elemento marcador seleccionable.

Cada una de estas secuencias se comenta más adelante.

Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia que codifica una "marca", es decir, una molécula de oligonucleótido localizada en el extremo 5' ó 3' de la secuencia que codifica el polipéptido IL-1R1; la secuencia de oligonucleótido codifica poliHis (tal como hexaHis) u otra "marca", tal como FLAG, HA (virus de la hemaglutinina influenza) o *myc* para los que existen anticuerpos comercialmente disponibles. Esta marca normalmente se fusiona con el polipéptido tras la expresión del polipéptido y puede servir como medio para purificación por afinidad o detección del anticuerpo de IL-1R1 de la célula hospedadora. La purificación por afinidad se puede conseguir mediante, por ejemplo, cromatografía en columna usando anticuerpos contra la marca como una matriz de afinidad. Opcionalmente, la marca puede separarse del polipéptido de IL-1R1 purificado por diversos medios, tal como usando determinadas peptidasas para escisión.

Las secuencias flanqueantes pueden ser homólogas (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula hospedadora), heterólogas (es decir, de una especie distinta a la especie o cepa de la célula hospedadora), híbridas (es decir, una combinación de secuencias flanqueantes de más de una fuente), sintéticas o nativas. Como tal, la fuente de una secuencia flanqueante puede ser cualquier organismo procarionta o eucariota, cualquier organismo vertebrado o invertebrado, o cualquier vegetal, siempre que la secuencia flanqueante sea funcional y pueda ser activada por la maquinaria de la célula hospedadora.

Las secuencias flanqueantes útiles en los vectores de esta invención se pueden obtener mediante varios métodos bien conocidos en la técnica. Típicamente, las secuencias flanqueantes útiles en esta memoria se han identificado previamente mediante representación en mapa y/o mediante digestión con endonucleasas de restricción y, por tanto, se pueden aislar de la fuente de tejido adecuada usando las endonucleasas de restricción adecuadas. En algunos casos, se puede conocer la secuencia de nucleótidos completa de una secuencia flanqueante. Aquí, la secuencia flanqueante se puede sintetizar usando los métodos descritos en esta memoria para síntesis de ácido nucleico o clonación.

Cuando se conoce toda, o solo una parte de la secuencia flanqueante, se puede obtener usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o mediante rastreo de un banco genómico con una sonda adecuada tal como un oligonucleótido y/o fragmento de secuencia flanqueante de la misma u otra especie. Cuando no se conoce la secuencia flanqueante, se puede aislar un fragmento de ADN que contiene una secuencia flanqueante de un trozo mayor de ADN que puede contener, por ejemplo, una secuencia codificadora o incluso otro gen o genes. El aislamiento se puede conseguir mediante digestión con endonucleasas de restricción para producir el fragmento de ADN adecuado, seguido de aislamiento usando purificación en gel de agarosa, cromatografía en columna Qiagen® (Chatsworth, CA) u otros métodos conocidos por el experto en la técnica. La selección de enzimas adecuadas para conseguir este fin será evidente para los expertos ordinarios en la técnica.

Típicamente, un origen de replicación es parte de los vectores de expresión procariontas adquiridos comercialmente y los auxiliares de origen en la amplificación del vector en una célula hospedadora. Si el vector de elección no contiene un origen de un sitio de replicación, se puede sintetizar químicamente uno en base a una secuencia conocida y se puede ligar en el vector. Por ejemplo, el origen de replicación del plásmido pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) es adecuado para la mayoría de las bacterias gram-negativas y diversos orígenes virales (*p. ej.*, SV40, polioma, adenovirus, virus de la estomatitis vesicular (VSV) o virus del papiloma, tal como HPV o BPV) son útiles para clonar vectores en células de mamíferos. En general, el componente origen de la replicación no es necesario para los vectores de expresión en mamíferos (por ejemplo, el origen de SV40 se utiliza a menudo únicamente, ya que también contiene el promotor temprano del virus).

Típicamente, una secuencia de terminación de la transcripción se localiza en 3' hasta el extremo de una región de codificación del polipéptido y sirve para terminar la transcripción. Habitualmente, una secuencia de terminación de la transcripción en células procariontas es un fragmento rico en G-C, seguido de una secuencia de poli-T. Aunque la secuencia se clona fácilmente a partir de un banco, o incluso puede adquirirse comercialmente como parte de un vector, también se puede sintetizar fácilmente usando métodos para la síntesis de ácidos nucleicos, tales como los descritos en esta memoria.

Un gen marcador seleccionable codifica una proteína necesaria para la supervivencia y el crecimiento de una célula hospedadora desarrollada en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, *p. ej.* ampicilina, tetraciclina o kanamicina para células hospedadoras procariontas, (b) complementan las deficiencias auxótrofas de la célula; o (c) suministran nutrientes cruciales no disponibles en el medio complejo o definido. Marcadores seleccionables preferidos son el gen de resistencia a kanamicina, el gen de resistencia a ampicilina y el gen de resistencia a tetraciclina. También se puede utilizar un gen de resistencia a neomicina para la selección en células hospedadoras tanto procariontas como eucariotas.

Otros genes seleccionables se pueden utilizar para amplificar el gen que se ha de expresar. La amplificación es el proceso en el cual los genes que tienen mayor demanda para la producción de una proteína crucial para el crecimiento o la supervivencia de la célula se repiten, en general en tándem, dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Ejemplos de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos incluyen dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidina quinasa sin promotor. Los transformantes de células de mamíferos se colocan

bajo presión de selección, de modo que solo los transformantes son adaptados para sobrevivir en virtud del gen seleccionable presente en el vector. La presión de selección se impone cultivando las células transformadas bajo condiciones en las que la concentración del agente de selección en el medio aumenta sucesivamente, conduciendo con ello a la amplificación tanto del gen seleccionable como del ADN que codifica otro gen, tal como el polipéptido IL-1R1 que comprende el vector. Como resultado se sintetizan mayores cantidades de un polipéptido, tal como el polipéptido IL-1R1 a partir del ADN amplificado.

Habitualmente se necesita un sitio de unión al ribosoma para el inicio de la traducción del ARNm y se caracteriza por una secuencia de Shine-Dalgarno (procariotas) o una secuencia de Kozak (eucariotas). Típicamente, el elemento se localiza en 3' del promotor y en 5' de la secuencia codificadora del polipéptido que se ha de expresar.

En algunos casos, tal como cuando se desea una glicosilación en un sistema de expresión de células hospedadoras eucarióticas, se pueden manipular varias pre- o pro-secuencias para mejorar la glicosilación o el rendimiento. Por ejemplo, se puede alterar el sitio de escisión de la peptidasa de un péptido señal concreto o se pueden añadir pro-secuencias, que también pueden afectar a la glicosilación. El producto proteico final puede tener, en la posición -1 (respecto al primer aminoácido de la proteína madura) uno o más aminoácidos adicionales que inciden sobre la expresión, que pueden no haberse eliminado del todo. Por ejemplo, el producto proteico final puede tener uno o dos residuos de aminoácidos encontrados en el sitio de escisión de la peptidasa unidos al extremo amino. Alternativamente, el uso de algunos sitios de escisión enzimática puede dar lugar a una forma ligeramente truncada del polipéptido deseado, si la enzima corta en dicha zona dentro del polipéptido maduro.

La expresión y los vectores de clonación de la invención contendrán típicamente un promotor que es reconocido por el organismo hospedadora y que está operativamente unido a la molécula que codifica el anticuerpo anti-IL-1R1. Los promotores son secuencias no traducidas localizadas aguas arriba (es decir, en 5') con respecto al codón de inicio de un gen estructural (generalmente en el intervalo de aproximadamente 100 a 1000 pb) que controla la transcripción del gen estructural. Los promotores se agrupan convencionalmente en una de dos clases: promotores inducibles y promotores constitutivos. Los promotores inducibles inician niveles incrementados de transcripción a partir de ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, tal como la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. Por el contrario, los promotores constitutivos inician la producción continua del producto génico; es decir, existe poco o ningún control sobre la expresión génica. Se conoce bien un gran número de promotores, reconocidos por una diversidad de células hospedadoras potenciales. Un promotor adecuado está unido operativamente al ADN que codifica la cadena pesada o la cadena ligera que comprende un anticuerpo anti-IL-1R1 de la invención, separando el promotor del ADN fuente por digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia del promotor deseada en el vector.

Promotores adecuados para uso con hospedadores de levaduras también son bien conocidos en la técnica. Los potenciadores de levaduras se usan de forma ventajosa con promotores de levadura. Promotores adecuados para uso con células hospedadoras de mamíferos son bien conocidos e incluyen, pero no se limitan a los obtenidos de los genomas de virus tales como el virus del polioma, el virus de la viruela, adenovirus (tal como Adenovirus 2), papilomavirus bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, retrovirus, virus de la hepatitis-B, y lo más preferiblemente, el virus 40 de simio (SV40). Otros promotores de mamífero adecuados incluyen promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo promotores del choque térmico y el promotor de actina.

Promotores adicionales que pueden ser de interés incluyen, pero no se limitan a: la región del promotor temprano del SV40 (Bernoist y Chambon, 1981, *Nature* 290:304-10); el promotor del CMV; el promotor contenido en la repetición larga en el extremo 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto *et al.*, 1980, *Cell* 22:787-97); el promotor de la timidina quinasa del herpes (Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1444-45); las secuencias reguladoras del gen de la metalotionina (Brinster *et al.*, 1982, *Nature* 296:39-42); vectores de expresión procariotas, tal como el promotor de la beta-lactamasa (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3727-31); o el promotor tac (DeBoer *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:21-25). También de interés son las siguientes regiones de control de la transcripción, que exhiben especificidad de tejido y que se han utilizado en animales transgénicos: la región de control del gen I de la elastasa que es activo en células acinares pancreáticas (Swift *et al.*, 1984, *Cell* 38:639-46; Ornitz *et al.*, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409 (1986); MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); la región de control del gen de la insulina que está activa en las células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-22); la región de control del gen de la inmunoglobulina que está activa en las células linfoides (Grosschedl *et al.*, 1984, *Cell* 38:647-58; Adames *et al.*, 1985, *Nature* 318:533-38; Alexander *et al.*, 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-44); la región de control del virus del tumor de mama de ratón que está activa en las células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder *et al.*, 1986, *Cell* 45:485-95); la región de control del gen de la albúmina que está activa en el hígado (Pinkert *et al.*, 1987, *Genes and Devel* 1:268-76); la región de control del gen de la alfa-feto-proteína que está activa en el hígado (Krumlauf *et al.*, 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-48; Hammer *et al.*, 1987, *Science* 235:53-58); la región de control del gen de la alfa-1-antitripsina que está activa en el hígado (Kelsey *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:161-71); la región de control del gen de la beta-globina que está activa en las células mieloides (Mogram *et al.*, 1985, *Nature* 315:338-40; Kollias *et al.*, 1986, *Cell* 46:89-94); la región de control del gen de la proteína básica de la mielina que está activa en las células oligodendrocitos en el cerebro (Readhead *et al.*, 1987, *Cell* 48:703-12); la región de control del gen de la cadena ligera 2 de la miosina que está activa en el músculo esquelético (Sani, 1985, *Nature* 314:283-86); y la región de control del gen de la hormona liberadora de la gonadotropina que está activa en el hipotálamo (Mason *et al.*, 1986,

Science 234:1372-78).

Una secuencia de potenciador se puede insertar en el vector para incrementar la transcripción del ADN que codifica la cadena ligera o la cadena pesada, que comprende un anticuerpo anti-IL-1R1 de la invención por parte de eucariotas superiores. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en *cis*, normalmente de una longitud de aproximadamente 10-300 pb, que actúan sobre el promotor para aumentar la transcripción. Los potenciadores son relativamente independientes de la orientación y la posición. Se han encontrado en 5' y 3' de la unidad de transcripción. Se conocen varias secuencias de potenciador de genes de mamífero (*p. ej.*, de globina, elastasa, albúmina, alfa-fetoproteína e insulina). Sin embargo, típicamente se utiliza un potenciador de un virus, El potenciador de SV40, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus y potenciadores de adenovirus son elementos potenciadores ilustrativos para la activación de promotores eucariotas. Aunque un potenciador se puede cortar y empalmar en un vector en una posición 5' ó 3' de una molécula de ácido nucleico, se localiza típicamente en un sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión de la invención pueden construirse a partir de un vector de partida, tal como un vector disponible comercialmente. Dichos vectores pueden o no contener todas las secuencias flanqueantes deseadas. En los casos en los que en el vector ya no está presente una o más de las secuencias flanqueantes descritas en esta memoria, pueden obtenerse individualmente y ligarse en el vector. Métodos para obtener cada una de las secuencias flanqueantes son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Una vez que se ha construido el vector y que se ha insertado en el sitio adecuado del vector una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera o la cadena pesada o la cadena ligera y la cadena pesada que comprenden un anticuerpo anti-IL-1R1, el vector completo se puede insertar en una célula hospedadora adecuada para la amplificación y/o expresión polipeptídica. La transformación de un vector de expresión para un anticuerpo anti-IL-1R1 en una célula hospedadora seleccionada se puede conseguir mediante métodos bien conocidos que incluyen transfección, infección, coprecipitación en fosfato cálcico, electroporación, microinyección, lipofección, transfección mediada por dextrano-DEAE u otras técnicas conocidas. El método seleccionado será parte de una función del tipo de célula hospedadora que se ha de utilizar. Los expertos en la técnica conocen bien estos métodos y otros métodos adecuados, y se recogen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, *supra*.

La célula hospedadora, cuando se cultiva en las condiciones adecuadas, sintetiza un anticuerpo anti-IL-1R1 que subsiguientemente se puede recoger del medio de cultivo (si la célula hospedadora lo secreta al medio) o directamente desde la célula hospedadora que lo produce (si no se secreta). La selección de una célula hospedadora adecuada dependerá de diversos factores, tales como niveles de expresión deseados, modificaciones de polipéptidos que son deseables o necesarias para la actividad (tales como glicosilación o fosforilación) y la facilidad de plegamiento en una molécula biológicamente activa.

En la técnica se conocen líneas celulares de mamífero disponibles como hospedadoras para expresión, e incluyen, pero no se limitan muchas líneas de células inmortalizadas disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC), que incluyen, pero no se limitan a células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (*p. ej.*, Hep G2), y un cierto número de otras líneas celulares. En determinadas realizaciones se pueden seleccionar líneas celulares determinando qué líneas celulares tienen niveles de expresión elevados y se pueden producir anticuerpos con propiedades de unión de IL-1R1 constitutivas. En otra realización se puede seleccionar una línea celular del linaje de las células B que no produce sus propios anticuerpos, pero que tiene capacidad para producir y secretar un anticuerpo heterólogo (*p. ej.*, líneas de células de mieloma de ratón NS0 y SP2/0).

Los anticuerpos de la invención son útiles para detectar IL-1R1 en muestras biológicas y para la identificación de células o tejidos que producen la proteína IL-1R1. Dichos anticuerpos que se unen a IL-1R1 y bloquean la interacción con otros compuestos de unión tienen uso terapéutico en la modulación de las enfermedades mediadas por IL-1. En realizaciones preferidas, los anticuerpos contra IL-1R1 pueden bloquear la unión de IL-1R1 a IL-1 β o IL-1 α , lo cual puede resultar en la alteración de la cascada de la transducción de señales de IL-1.

Los anticuerpos de la invención que se unen específicamente a IL-1R1 pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades mediadas por IL-1, tal como se comenta más adelante. Dichos anticuerpos se pueden utilizar en los ensayos de unión para detectar la unión de IL-1R1 y su capacidad para inhibir la formación de IL-1 R1 de un complejo con IL-1 β y la proteína accesorio de IL-1R (IL-1RAcP) o con IL-1 α e IL-1RAcP.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona métodos para tratar trastornos médicos asociados con reacciones inflamatorias mediadas por IL-1 o reacciones inmunorreguladoras mediadas por IL-1. Los métodos de la invención incluyen administrar un anticuerpo anti-IL1R1 de la invención a un individuo que esté afectado con una enfermedad inflamatoria o inmunorreguladora que está mediada por IL-1. Tal como se usa en esta memoria, los términos "enfermedad", "malestar", "afección médica" o "afección anormal" se utilizan de forma indistinta con la expresión "trastorno médico".

En una realización particular, los métodos de la invención implican administrar a un paciente un anticuerpo anti-IL1R1

de la invención, evitando con ello la unión de IL-1 a su receptor de la superficie celular (IL-1R1).

Para tratar un trastorno médico caracterizado por la expresión anormal o en exceso de IL-1 o una señalización anormal o en exceso de IL-1, una molécula que comprende un anticuerpo de IL-1R de tipo I de esta invención se administra al paciente en una cantidad y durante un tiempo suficiente para inducir una mejora sostenida en al menos un indicador que refleja la gravedad del trastorno. Una mejora se considera "sostenida" si el paciente exhibe la mejora al menos dos ocasiones separadas por una a cuatro semanas. El grado de mejora se determina en base a los signos o síntomas y también se pueden emplear cuestionarios que se administran al paciente, tales como cuestionarios de la calidad de vida.

Diversos indicadores que reflejan la extensión de la enfermedad del paciente se pueden evaluar para determinar si la cantidad y el tiempo de tratamiento son suficientes. El valor basal para el indicador o indicadores escogidos se establece mediante el examen del paciente antes de la administración de la primera dosis del anticuerpo. Preferentemente, el examen basal se realiza en el espacio de aproximadamente 60 días de la administración de la primera dosis. Si el anticuerpo IL-1R se está administrando para tratar síntomas agudos tales como, por ejemplo, para tratar lesiones traumáticas (lesión traumática de la rodilla, apoplejía, lesión en la cabeza, etc.), la primera dosis se administra lo antes posible después de que se produzca la lesión o el fenómeno.

La mejora se induce administrando repetidamente una dosis del anticuerpo hasta que el paciente manifieste una mejora sobre la situación basal para el indicador o indicadores elegidos. Al tratar afecciones crónicas, este grado de mejora se obtiene administrando repetidamente este medicamento durante un periodo de al menos un mes o más, por ejemplo durante uno, dos o tres meses o más, o indefinidamente. Un periodo de uno a seis semanas, o incluso una sola dosis, es a menudo suficiente para tratar las afecciones agudas.

Aunque el grado de la enfermedad del paciente tras el tratamiento puede parecer que ha mejorado de acuerdo con una o más indicadores, el tratamiento puede continuar indefinidamente al mismo nivel o a una dosis o frecuencia reducida. Una vez que se ha reducido o interrumpido el tratamiento, más adelante se puede retomar al nivel original si los síntomas reaparecen.

Se puede utilizar cualquier vía de administración eficaz para administrar terapéuticamente el anticuerpo. El anticuerpo se puede inyectar vía intraarticular, intravenosa, intramuscular, intralesional, intraperitoneal, intracraneal, inhalatoria o subcutánea, mediante inyección en bolo o mediante infusión continua. Por ejemplo, las enfermedades pulmonares pueden implicar métodos intranasales e inhalatorios. Otros medios adecuados de administración incluyen la liberación sostenida de implantes, inhalación por aerosol, gotas oculares, preparados orales, incluidos píldoras, jarabes, pastillas o goma masticable, y preparados tópicos tales como lociones, geles, sprays, ungüentos u otras técnicas adecuadas. La administración mediante inhalación es particularmente beneficiosa cuando se tratan enfermedades asociadas con trastornos pulmonares.

En una realización de la invención se puede administrar un anticuerpo anti-IL-1R1 de la invención una vez al mes. En otra realización, el anticuerpo se administra una vez cada dos semanas o una vez a la semana para tratar los diversos trastornos médicos descritos en esta memoria. Todavía en otra realización, el anticuerpo se administra al menos dos veces a la semana y en otra realización se administra al menos una vez al día. Un paciente adulto es una persona que tiene 18 o más años de edad. Si se inyecta, la cantidad eficaz por dosis de adulto varía de 1-200 mg/m², o de 1-40 mg/m² o de aproximadamente 5-25 mg/m². Alternativamente, se puede administrar una dosis única cuya cantidad puede oscilar entre 2-400 mg/dosis, 2-100 mg/dosis o de aproximadamente 10-80 mg/dosis. Si la dosis se ha de administrar más de una vez a la semana, una dosis ilustrativa está en el mismo intervalo que los intervalos de dosis descritos anteriormente o menor. En una realización de la invención, las diversas indicaciones que se describen más adelante se tratan administrando un preparado aceptable para inyección que contiene el anticuerpo receptor de IL-1 a 80-100 mg/dosis o, alternativamente, que contiene 80 mg por dosis. La dosis se administra repetidamente. Si se usa una vía de administración distinta a la inyección, la dosis se ajusta adecuadamente de acuerdo con las prácticas médicas convencionales. Por ejemplo, si la vía de administración es inhalación, la dosificación puede ser de una a siete veces a la semana a intervalos de dosis de 10 mg/dosis a 50 mg por dosis.

En realizaciones preferidas, la invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una o una pluralidad de los anticuerpos de la invención junto con un diluyente, vehículo, solubilizante, emulsionante, conservante y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, los materiales aceptables para formulación son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleados. En realizaciones preferidas, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpos anti-IL-1R1.

En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la transparencia, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o liberación, la adsorción o penetración de la composición. En dichas realizaciones, los materiales de formulación adecuados incluyen, pero no se limitan a aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); agentes antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrógeno-sulfito de sodio); tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u

5 otros ácidos orgánicos); agentes de carga (tales como manitol o glicina), agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminetetraacético (EDTA)); agentes de formación de complejos (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monosacáridos; disacáridos; y otros hidratos de carbono (tales como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes; agentes aromatizantes y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; iones conjugados de formación de sal (tal como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenilico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerol, propilenglicol o polietilenglicol); azúcar-alcoholes (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o 10 agentes humectantes (tales como pluronics, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbatos tales como polisorbato 20, polisorbato 80, triton, trimetamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes potenciadores de la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos, preferiblemente cloruro de sodio o potasio, manitol sorbitol); vehículos de administración; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. Véase *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª Edición, (A.R. Gennaro, comp.) 1990, Mack 15 Publishing Company.

En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica óptima la determinará un experto en la técnica dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración pretendida, el formato de liberación y la dosificación deseada. Véase por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, *supra*. En determinadas realizaciones, dichas 20 composiciones pueden influir sobre el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad del aclaramiento *in vivo* de los anticuerpos de la invención.

En determinadas realizaciones, el vehículo o soporte primario en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o soporte adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente suplementado con otros materiales habituales en 25 composiciones para la administración parenteral. Otros vehículos ilustrativos son solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina sérica. En realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas comprenden tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5, o tampón acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, y puede incluir, además, sorbitol o un sustituto adecuado del mismo. En determinadas realizaciones de la invención, pueden prepararse composiciones de anticuerpos anti-IL-1R1 para almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado de pureza deseado con agentes de formulación opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 30 *supra*) en forma de una torta liofilizada o una disolución acuosa. Además, en determinadas realizaciones, el producto anticuerpo anti-IL-1R1 puede formularse como un liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.

35 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden seleccionarse para la administración parenteral. Las composiciones pueden seleccionarse para inhalación o liberación a través del tracto digestivo, tal como por vía oral. La preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables de este tipo está dentro de los conocimientos de la técnica.

40 Los componentes de la formulación están presentes, preferiblemente, en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. En determinadas realizaciones se utilizan tampones para mantener la composición a pH fisiológico o a pH ligeramente inferior, normalmente dentro de un intervalo de pH de desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 8.

45 Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para su uso en esta invención pueden proporcionarse en forma de una disolución acuosa, parenteralmente aceptable, apirógena, que comprende el anticuerpo anti-IL-1R1 deseado en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para la inyección parenteral es agua destilada estéril en la que el anticuerpo anti-IL-1R1 se formula como una disolución isotónica, estéril, conservada de manera apropiada. En determinadas realizaciones, la preparación puede implicar la 50 formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bio-erosionables, compuestos poliméricos (tal como ácido poliláctico o ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que pueden proporcionar la liberación controlada o sostenida del producto que puede ser administrado por medio de una inyección de depósito. En determinadas realizaciones, también puede usarse ácido hialurónico y esto puede tener el efecto de fomentar la duración sostenida en la circulación. En determinadas realizaciones, se pueden usar dispositivos implantables de 55 liberación de fármaco para introducir la molécula de anticuerpo deseada.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para inhalación. En estas realizaciones, los anticuerpos anti-IL-1R1 se formulan en forma de polvo seco para inhalación. En realizaciones preferidas pueden formularse soluciones para inhalación de anticuerpo anti-IL-1R1 con un agente propelente para la administración de aerosol. En determinadas realizaciones, pueden nebulizarse disoluciones. Se describen además la administración pulmonar y métodos de formulación en la publicación de patente internacional nº WO 94/20069, que describe la 60 administración de proteínas químicamente modificadas.

También se contempla que las formulaciones pueden administrarse por vía oral. Se pueden formular anticuerpos Anti-IL-1R1 que se administran de este modo con o sin los soportes utilizados normalmente en la composición de formas de dosificación sólidas, tales como comprimidos y cápsulas. En determinadas realizaciones, se puede diseñar una cápsula 65

para liberar la parte activa de la formulación en el punto del tracto gastrointestinal en el que se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación pre-sistémica. Pueden incluirse agentes adicionales para facilitar la absorción del anticuerpo anti-IL-1R1. También pueden emplearse diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes desintegrantes de comprimidos y aglutinantes.

Se proporciona preferiblemente una composición farmacéutica de la invención para que comprenda una cantidad eficaz de uno o una pluralidad de anticuerpos anti-IL-1R1 en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Mediante la disolución de los comprimidos en agua estéril, u otro vehículo apropiado, pueden prepararse disoluciones en forma de dosis unitaria. Excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato o bicarbonato de sodio, lactosa o fosfato de calcio; o agentes aglutinantes tales como almidón, gelatina o goma arábiga; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Composiciones farmacéuticas adicionales resultarán evidentes para los expertos en la técnica, incluyendo formulaciones que implican moléculas de anticuerpos anti-IL-1R1 en formulaciones de liberación sostenida o controlada. Los expertos en la técnica conocen también técnicas para formular una diversidad de otros medios de liberación sostenida o controlada tales como vehículos de liposoma, micropartículas bio-erosionables o perlas porosas e inyecciones de depósito. Véase por ejemplo, la publicación de patente internacional n° WO 93/15722, que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la liberación de composiciones farmacéuticas. Preparados de liberación sostenida pueden incluir matrices de polímero semipermeables en forma de artículos conformados, p. ej. películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas (tal como se describe en la patente de EE.UU. n° 3.773.919 y la publicación de solicitud de patente europea n° EP 058481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, 1983, *Biopolymers*, 22:547-556), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15:167-277, y Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105), etileno-acetato de vinilo (Langer *et al.*, 1981, *supra*) o ácido poli-D(-) -3-hidroxibutírico (publicación de solicitud de patente europea n° EP 133.988). Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas, que pueden prepararse mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Eppstein *et al.* 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688-3692; publicaciones de solicitud de patentes europeas n°s EP 036.676; EP 088.046 y EP 143.949.

Las composiciones farmacéuticas utilizadas para la administración *in vivo* normalmente se proporcionan como preparados estériles. La esterilización puede realizarse mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición está liofilizada, la esterilización utilizando este procedimiento puede realizarse antes de o tras la liofilización y reconstitución. Las composiciones para la administración parenteral pueden almacenarse en forma liofilizada o en una disolución. Las composiciones parenterales se colocan generalmente en un recipiente que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo un vial o bolsa de disolución intravenosa que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica.

Una vez que se ha formulado la composición farmacéutica, ésta puede almacenarse en viales estériles en forma de una disolución, suspensión, gel, emulsión, sólido o un polvo deshidratado o liofilizado. Tales formulaciones pueden almacenarse o bien en forma lista para su uso o bien en forma (p. ej. liofilizada) que requiere la reconstitución antes de la administración.

La invención también proporciona kits para producir una unidad de administración de una sola dosis. Los kits de la invención pueden contener cada uno tanto un primer recipiente que tiene una proteína secada como un segundo recipiente que tiene una formulación acuosa. En determinadas realizaciones de esta invención se proporcionan kits que contienen jeringas precargadas de una única cámara y de múltiples cámaras (p. ej. jeringas de líquidos y liojeringas).

La cantidad eficaz de una composición farmacéutica que contiene anticuerpo anti-IL-1R1 que ha de emplearse terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto y los objetivos terapéuticos. Un experto en la técnica apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento variarán dependiendo, en parte, de la molécula suministrada, de la indicación para la que está utilizándose el anticuerpo anti-IL-1R1, de la vía de administración y del tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y/o estado (la edad y salud general) del paciente. En determinadas realizaciones, el médico puede valorar la dosificación y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 0,1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg o más, en función de los factores mencionados anteriormente. En realizaciones preferidas, la dosificación puede variar desde 0,1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; más preferentemente de 1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o incluso más preferiblemente de 5 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg.

La frecuencia de la dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos del anticuerpo anti-IL-1R1 particular en la formulación utilizada. Normalmente, un médico administra la composición hasta que se alcanza una dosificación que logra el efecto deseado. Por tanto, la composición puede administrarse como dosis única, o como dos o más dosis (que pueden o no contener la misma cantidad de la molécula deseada) a lo largo del tiempo o como infusión continua a través de un dispositivo de implantación o catéter. El perfeccionamiento adicional de la dosificación apropiada lo realizan de forma rutinaria los expertos en la técnica y está dentro del ámbito de las tareas realizadas rutinariamente por ellos. Pueden comprobarse dosificaciones apropiadas mediante el uso de datos de respuesta a la dosis apropiados.

La vía de administración de la composición farmacéutica está de acuerdo con los métodos conocidos, *p. ej.* por vía oral, a través de inyección por vías intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intra-parenquimatosa), intracerebroventricular, intramuscular, intra-ocular, intra-arterial, intraportal o intralesional; mediante sistemas de liberación sostenida o mediante dispositivos de implantación. En determinadas realizaciones, las composiciones pueden administrarse mediante inyección en bolo o de manera continua mediante infusión, o mediante dispositivo de implantación.

La composición también puede administrarse por vía local por medio de implantación de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el que se ha absorbido o encapsulado la molécula deseada. En determinadas realizaciones, cuando se utiliza un dispositivo de implantación, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y la administración de la molécula deseada puede ser por medio de difusión, bolo de liberación gradual o administración continua.

También puede ser deseable utilizar composiciones farmacéuticas con el anticuerpo anti-IL-1R1 de acuerdo con la invención *ex vivo*. En tales casos, las células, los tejidos u órganos que se han extraído del paciente se exponen a las composiciones farmacéuticas con el anticuerpo anti-IL-1R1, tras lo cual las células, los tejidos y/u órganos se implantan posteriormente de nuevo en el paciente.

En particular, los anticuerpos anti-IL-1R1 pueden administrarse mediante la implantación de determinadas células que se han modificado mediante ingeniería genética, utilizando métodos como los descritos en esta memoria, para expresar y secretar el polipéptido. En determinadas realizaciones, tales células pueden ser células animales o humanas, y pueden ser autólogas, heterólogas o xenogénicas. En determinadas realizaciones, las células pueden inmortalizarse. En otras realizaciones, con el fin de reducir la probabilidad de una respuesta inmunológica, las células pueden encapsularse para evitar la infiltración de tejidos circundantes. En realizaciones adicionales, los materiales de encapsulación son, típicamente, membranas o envolturas poliméricas semipermeables, biocompatibles que permiten la liberación del o de los productos de proteína, pero evitan la destrucción de las células mediante el sistema inmunitario del paciente o mediante otros factores perjudiciales de los tejidos circundantes.

En determinadas realizaciones, la invención abarca además la administración de un anticuerpo anti-IL-1R1 o la composición farmacéutica de la invención de forma concurrente con uno o más fármacos que se administran al mismo paciente, administrándose cada fármaco de acuerdo con un régimen adecuado para dicho medicamento. Esto abarca pre-tratamiento, tratamiento simultáneo, tratamiento secuencial y regímenes alternativos. Ejemplos de dichos fármacos incluyen, pero no se limitan a antivirales, antibióticos, analgésicos, corticosteroides, antagonistas de citocinas inflamatorias, fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARDs) y antiinflamatorios no esteroideos.

En otras realizaciones, un anticuerpo anti-IL-1R1 o composición farmacéutica de la invención se puede administrar en combinación con otros inhibidores de citocinas, incluidos los que antagonizan, por ejemplo, RANKL, TGF β , IFN γ , IL-6 o IL-8 y TNF, particularmente TNF α . En combinación con IL-6, un anticuerpo de esta invención se puede usar para tratar y prevenir la recurrencia de convulsiones, incluidas las convulsiones inducidas por antagonismo del receptor del GABA $_A$, las convulsiones asociadas con episodios de apoplejía en EEG y convulsiones límbicas motoras que se producen durante el estado epiléptico. En combinación con el inhibidor de IFN γ , un anticuerpo de esta invención es útil en el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática y la fibrosis quística. La combinación de un anticuerpo del receptor de IL-1 e inhibidores de RANKL, *p. ej.* un anticuerpo RANKL, es útil para prevenir la destrucción ósea en diversos contextos, incluidos, pero no limitados a diversos trastornos reumáticos, osteoporosis, mieloma múltiple u otras neoplasias malignas que producen una degeneración ósea, o terapia antitumoral dirigida a la prevención de las metástasis óseas o destrucción ósea asociada con residuos por desgaste de prótesis o con periodontitis. Además, los anticuerpos de la invención se pueden administrar en combinación con inhibidores de IL-17 tales como formas solubles de un receptor de IL-17 (tal como IL-17R:Fc) o un anticuerpo de IL-17 o un anticuerpo de IL-17R, proteína de unión a IL-18, formas solubles de los receptores IL-18 y anticuerpos contra IL-18, anticuerpos contra los receptores de IL-18 o anticuerpos contra el ligando CD30 o contra CD4.

La invención abarca, además, métodos para utilizar un anticuerpo anti-IL1R1 o composición farmacéutica de la invención en el tratamiento de trastornos médicos descritos en esta memoria, en combinación con un inhibidor de TNF, preferiblemente TNFR:Fc (ENBREL®) y cualquier combinación de las citocinas o inhibidores de citocinas arriba descritos que son agentes activos en terapias de combinación. Por ejemplo, de acuerdo con la presente invención, métodos de terapia de combinación se pueden utilizar para tratar artritis reumatoide, apoplejía, asma, psoriasis, etc.

Las afecciones tratadas de forma eficaz mediante un anticuerpo anti-IL-1R1 o una composición farmacéutica descrita en esta memoria incluyen enfermedades pulmonares, tales como asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, proteinosis alveolar pulmonar, neumopatía inducida por bleomicina y fibrosis, fibrosis pulmonar inducida por radiación, fibrosis quística, acumulación de colágeno en los pulmones y ARDS, todas ellas se pueden tratar con combinaciones de un anticuerpo contra IL-1R y un inhibidor de IL-4 y/o un inhibidor de IL-13, *p. ej.* un anticuerpo contra IL-4R que inhibe la actividad de IL-13 e IL-4. Los anticuerpos y las composiciones farmacéuticas descritos de la invención también son útiles para tratar la displasia bronco-pulmonar (DBP), enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (*p. ej.*, enfisema y bronquitis crónica) y enfermedad pulmonar fibrótica crónica de lactantes prematuros. Además, los compuestos, composiciones y terapias de combinación de la invención se utilizan para tratar enfermedades pulmonares

ocupacionales, incluidas asbestosis, neumoconiosis del trabajador del carbón, silicosis o afecciones similares asociadas con la exposición a largo plazo a partículas finas. En otros aspectos de la invención, los compuestos, composiciones y terapias de combinación descritas se utilizan para tratar la bronquiolitis obliterante con neumonía organizada, fibrosis pulmonar, incluidas fibrosis pulmonar idiopática y fibrosis pulmonar inducida por radiación, sarcoidosis pulmonar y alergias, incluidas rinitis alérgica, dermatitis de contacto, dermatitis atópica y asma.

Dichas combinaciones son útiles también para tratar pacientes que sufren diversos trastornos cutáneos, que incluyen, pero no se limitan a dermatitis herpetiforme (enfermedad de Duhring) , dermatitis atópica , dermatitis de contacto, urticaria (incluida la urticaria idiopática crónica) y enfermedades ampollosas autoinmunes, incluidos el pénfigo vulgar y el pénfigoide bulboso. Otras enfermedades que se pueden tratar con la combinación de un anticuerpo IL-1R y un inhibidor de IL-4 y/o IL-13 incluyen miastenia grave, sarcoidosis, incluida la sarcoidosis pulmonar, esclerodermia, artritis reactiva, síndrome de hiper IgE, esclerosis múltiple y síndrome hipereosinófilo idiopático. La combinación se usa también para tratar reacciones alérgicas a la medicación y como adyuvante para la inmunoterapia de la alergia.

Los anticuerpos contra el receptor de IL-1 y las composiciones farmacéuticas descritas en esta memoria son útiles para tratar enfermedades de protozoos, incluidas malaria y esquistosomiasis, y para tratar el eritema nodoso leproso; la meningitis bacteriana o vírica, la tuberculosis, incluida la tuberculosis pulmonar, y la neumonitis secundaria a una infección vírica o bacteriana, incluyendo la infección de gripe y la mononucleosis infecciosa.

Las afecciones y lesiones cardiovasculares son tratables y/o prevenibles con las composiciones farmacéuticas descritas o anticuerpos anti-IL-1R1 solos o en combinación con otros inhibidores de las citocinas. Trastornos cardiovasculares tratables incluyen aneurismas aórticos, incluidos aneurismas aórticos abdominales, síndrome coronario agudo, arteritis; oclusión vascular, incluida la oclusión arterial cerebral; complicaciones de la cirugía de derivación coronaria; lesión por isquemia/reperfusión; enfermedad cardíaca, incluida la enfermedad cardíaca aterosclerótica, miocarditis, incluida la miocarditis autoinmunitaria crónica y la miocarditis vírica; insuficiencia cardíaca, incluida la insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca congestiva, caquexia de insuficiencia cardíaca; infarto de miocardio; reestenosis y/o aterosclerosis tras cirugía del corazón o tras procesos angioplásticos con globo de la arteria carótida; isquemia miocárdica silente; disfunción de la bomba ventricular izquierda, complicaciones post-implantación de los dispositivos de ayuda del ventrículo izquierdo; fenómeno de Raynaud; tromboflebitis; vasculitis, incluida la vasculitis de Kawasaki, enfermedad veno-oclusiva, arteritis de células gigantes, granulomatosis de Wegener, confusión mental tras cirugía de derivación cardiopulmonar y púrpura de Schoenlein-Henoch.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-IL-1R1 y las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden utilizar para tratar afecciones de dolor crónico, tales como dolor pélvico crónico, incluyendo prostatitis crónica/síndrome del dolor pélvico y dolor postherpético.

Los trastornos del sistema endocrino, incluidos diabetes de inicio juvenil (incluye la diabetes mellitus autoinmunitaria y los tipos de diabetes dependiente de insulina) y diabetes de inicio en la madurez (incluye la diabetes no dependiente de insulina y mediada por obesidad) también se pueden tratar con anticuerpos anti-IL-1R1 o composiciones farmacéuticas de la invención. Dicho tratamiento incluye afecciones secundarias asociadas con la diabetes, tales como retinopatía diabética, rechazo de trasplante renal en pacientes diabéticos, resistencia a la insulina mediada por obesidad e insuficiencia renal, que, en sí misma, se puede asociar con proteinuria e hipertensión. Otros trastornos endocrinos también se pueden tratar con estos compuestos e incluyen enfermedad de ovario poliquístico, adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X, hipotiroidismo y tiroiditis, incluida la tiroiditis de Hashimoto (es decir, tiroiditis autoinmunitaria), disfunción de células tiroideas, incluido el síndrome del enfermo eutiroideo.

Las afecciones del sistema gastrointestinal se pueden tratar y prevenir con anticuerpos anti-IL-1R1 o composiciones farmacéuticas de la invención, solos o en combinación con otros productos terapéuticos. Estas afecciones incluyen enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn; colitis ulcerosa; gastroparesia idiopática; pancreatitis, incluidas pancreatitis crónica; pancreatitis aguda, enfermedad intestinal inflamatoria y úlceras, incluidas las úlceras gástricas y duodenales.

Los trastornos del sistema genito-urinario también se pueden tratar o prevenir con anticuerpos anti-IL-1R1 o composiciones farmacéuticas descritas en esta memoria. Dichos trastornos incluyen glomerulonefritis, incluyendo glomerulonefritis autoinmune, glomerulonefritis debido a la exposición a toxinas o glomerulonefritis secundaria a infecciones con estreptococos hemolíticos u otros agentes infecciosos. También se pueden tratar con compuestos, composiciones y terapias de combinación de la invención el síndrome urémico y sus complicaciones clínicas (por ejemplo, insuficiencia renal, anemia y miocardiopatía hipertrofica), incluido el síndrome urémico asociado con la exposición a toxinas ambientales, fármacos u otras causas. Las complicaciones que surgen por la inflamación de la pared de la vesícula biliar que conduce a la alteración de la función de absorción se pueden tratar o prevenir con anticuerpos de esta invención. En dichas complicaciones se incluyen colelitiasis (cálculos) y coliedocolelitiasis (cálculos en el conducto biliar) y la recurrencia de colelitiasis y coliedocolelitiasis. Afecciones adicionales tratables con los compuestos, composiciones y terapias de combinación de la invención son complicaciones de la hemodiálisis; afecciones prostáticas, incluidas hipertrofia prostática benigna, prostatitis no bacteriana y prostatitis crónica; y complicaciones de la hemodiálisis.

En esta memoria también se proporcionan métodos para utilizar anticuerpos anti-IL-1R1 de la invención, composiciones y terapias de combinación para tratar diversos trastornos hematológicos y oncológicos. Por ejemplo, los anticuerpos

anti-IL-1R1, solos o en combinación con otros inhibidores de citocinas u otros agentes activos, como se ha descrito anteriormente, se pueden utilizar para tratar diversas formas de cáncer, incluidos leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, carcinoma nasofaríngeo positivo para el virus de Epstein-Barr, glioma, cánceres de colon, estómago, próstata, de células renales, cervical y ovárico, cáncer de pulmón (SCLC y NSCLC), incluyendo caquexia asociada con cáncer, fatiga, astenia, síndrome paraneoplásico de caquexia e hipercalcemia. También se pueden tratar tumores sólidos, incluidos sarcoma, osteosarcoma, y carcinoma, tal como adenocarcinoma (por ejemplo, cáncer de mama) y carcinoma de células escamosas. Cánceres tratables adicionales incluyen cáncer de esófago, cáncer gástrico, carcinoma de vesícula biliar, leucemia, incluidas leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia mielóide, leucemia linfoblástica aguda o crónica y leucemia de células peludas. Otras neoplasias malignas con potencial metastático invasivo, incluido el mieloma múltiple, se pueden tratar con los compuestos, composiciones y terapias de combinación objeto.

Además, los anticuerpos anti-IL1R1 descritos se pueden utilizar para tratar anemias y trastornos hematológicos, incluidos neutropenia idiopática crónica, anemia de enfermedad crónica, anemia aplásica, incluida la anemia aplásica de Fanconi; púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), púrpura trombocitopénica trombótica; síndromes mielodisplásicos (incluida anemia refractaria, anemia refractaria con sideroblastos en anillo, anemia refractaria con exceso de blastos, anemia refractaria con exceso de blastos en transformación); mielofibrosis/metaplasia mielóide; y crisis vasooclusiva de drepanocitos.

Diversos trastornos linfoproliferativos también se pueden tratar con anticuerpos anti-IL-1R1 de la invención, incluidos síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (ALPS), leucemia linfoblástica crónica, leucemia de células peludas, leucemia linfática crónica, linfoma de células T periféricas, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma de Burkitt, linfoma de células T positivas para el virus de Epstein-Barr, linfoma histiocítico, enfermedad de Hodgkin, linfoma agresivo difuso, leucemias linfáticas agudas, enfermedad linfoproliferativa gamma de células T, linfoma cutáneo de células B, linfoma cutáneo de células T (es decir, fungoides micosis) y síndrome de Sézary .

Afecciones hereditarias, tales como enfermedad de Gaucher, enfermedad de Huntington, enfermedad de IgA lineal y distrofia muscular se pueden tratar con los anticuerpos de la presente invención.

Otras afecciones que se pueden tratar o prevenir con los anticuerpos del receptor de IL-1 descritos o las composiciones farmacéuticas incluyen las que resultan de lesiones en la cabeza o la médula espinal, incluyendo hematoma subdural debido al traumatismo en la cabeza. En relación con esta terapia, las composiciones y combinaciones descritas son adecuadas para prevenir los daños neurológicos craneales y prevenir y tratar los dolores de cabeza cervicogénicos. Las composiciones y combinaciones descritas son además adecuadas para tratar los efectos secundarios neurológicos asociados con la irradiación del cerebro.

Los anticuerpos anti-IL-1R1 y la composición farmacéutica de la invención son también útiles para tratar afecciones del hígado tales como hepatitis, incluidas hepatitis alcohólica aguda, hepatitis aguda viral o inducida por fármaco, hepatitis A, B y C, colangitis esclerosante, epitelio sinusoide hepático e inflamación hepática por causas desconocidas.

Trastornos que implican pérdida de audición y que están asociados con la expresión anormal de la IL-1 se pueden tratar con los anticuerpos anti-IL-1R1 o las composiciones farmacéuticas de la invención. Dichos trastornos incluyen pérdida de audición asociada con el nervio coclear que se piensa que es el resultado de un proceso autoinmunitario, es decir pérdida de audición autoinmunitaria. También se pueden tratar o prevenir con los anticuerpos anti-IL-1R1 o las composiciones farmacéuticas de la invención el síndrome de Meniere y el colesteatoma, un trastorno del oído medio a menudo asociado con la pérdida de audición.

Trastornos no artríticos de los huesos y las articulaciones también se pueden tratar con los anticuerpos descritos en esta memoria. Esto abarca trastornos de los osteoclastos que conducen a la pérdida de hueso tales como, pero no limitados a osteoporosis, incluida la osteoporosis posmenopáusica, osteoartritis, periodontitis resultante de la pérdida o aflojamiento de dientes, y aflojamiento de prótesis tras sustitución articular (generalmente en asociación con una respuesta inflamatoria a los residuos por desgaste). Esta última afección también se denomina "osteólisis del implante ortopédico". Otra afección que se puede tratar con los compuestos, composiciones y terapias de combinación de la invención es la disfunción articular mandibular (TMJ).

Los anticuerpos anti-IL-1R1 o las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden utilizar para tratar trastornos reumáticos, incluyendo artritis reumática adulta y juvenil; esclerodermia; lupus eritematoso sistémico; gota; osteoartritis; polimialgia reumática; espondiloartropatías sero-negativas, incluyendo la espondilitis anquilosante, y la enfermedad de Reiter, artritis psoriásica y artritis crónica de Lyme. Los anticuerpos de la presente invención también son útiles para tratar la inflamación del músculo voluntario y otros músculos, incluidos dermatomiositis, miositis de cuerpos de inclusión, polimiositis y linfanfoleiomiosomatosis.

Otro uso para los anticuerpos y las composiciones farmacéuticas de la invención es el tratamiento y/o prevención de la amiloidosis primaria y la amiloidosis secundaria que es característica de diversas afecciones, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, amiloidosis reactiva secundaria; síndrome de Down y amiloidosis asociada con diálisis. También se pueden tratar con los anticuerpos o las composiciones farmacéuticas de la invención los síndromes de fiebre periódica

hereditaria, incluyendo la fiebre mediterránea familiar, hiperinmunoglobulina D y síndrome de fiebre periódica y síndromes periódicos asociados con el receptor del TNF (TRAPS).

En otras realizaciones, los anticuerpos o las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden usar para tratar trastornos que afectan a la piel o a las membranas mucosas. Estos trastornos incluyen enfermedades acantolíticas, incluyendo enfermedad de Darier, queratosis folicular y pénfigo vulgar. Trastornos de la piel adicionales que se pueden tratar utilizando los anticuerpos de la invención incluyen acné, acné rosáceo, alopecia areata, estomatitis aftosa, penfigoide bulloso, quemaduras, eczema, eritema, incluido eritema multiforme y eritema multiforme bulloso (síndrome de Stevens-Johnson), enfermedad cutánea inflamatoria, liquen plano, enfermedad ampollosa por IgA lineal (dermatosis ampollosa crónica de la infancia), pérdida de elasticidad de la piel, úlceras en la superficie mucosa, incluidas úlceras gástricas, dermatitis neutrofílica (síndrome de Sweet), dermatomiositis, pitiriasis rubra pilaris, psoriasis, pioderma gangrenoso, reticulohistiocitosis multicéntrica y necrólisis epidérmica tóxica. Otras afecciones relacionadas con la piel que se pueden tratar con las terapias y terapias de combinación de la presente invención incluyen dermatitis herpetiforme.

Trastornos adicionales que se pueden tratar con los anticuerpos o las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen la enfermedad del injerto contra el hospedante y complicaciones resultantes de trasplantes de órganos sólidos, tales como trasplantes de corazón, hígado, piel, riñón, pulmón (obstrucción de las vías respiratorias tras trasplante de pulmón) u otros trasplantes, incluidos los trasplantes de médula ósea.

Los trastornos oculares también se pueden tratar o prevenir con los anticuerpos anti-IL1R1 o las composiciones farmacéuticas descritos, incluidos desprendimiento de retina regmatógena y enfermedad ocular inflamatoria, incluida la enfermedad ocular inflamatoria asociada con el tabaquismo y la degeneración macular.

Los anticuerpos o composiciones farmacéuticas de la invención, tal como se describe en esta memoria, son útiles para tratar trastornos que afectan al sistema reproductor femenino. Ejemplos incluyen, entre otros, insuficiencia múltiple de implantes/infertilidad; síndrome de pérdida fetal o pérdida del embrión IV (aborto espontáneo); embarazos preeclámpicos o eclampsia; endometriosis, cervicitis crónica y parto prematuro.

Además, los anticuerpos o composiciones farmacéuticas de la invención son útiles para tratar y/o prevenir la ciática, los síntomas del envejecimiento, las reacciones farmacológicas graves (por ejemplo, toxicidad por IL-2 o neumopatía inducida por bleomicina y fibrosis) o para suprimir la respuesta inflamatoria antes, durante o después de la transfusión de glóbulos rojos alogénicos en cirugía cardíaca o de otro tipo, o en el tratamiento de lesiones no traumáticas de una extremidad o articulación, tal como la lesión traumática de la rodilla. Otros diversos trastornos médicos que se pueden tratar con los anticuerpos anti-IL-1R1 o las composiciones farmacéuticas incluyen esclerosis múltiple; síndrome de Behcet; síndrome de Sjogren, anemia hemolítica autoinmunitaria; beta talasemia, esclerosis lateral amiotrófica (enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad de Parkinson; y tenosinovitis de causa desconocida, así como diversos trastornos autoinmunitarios o enfermedades asociadas con deficiencias hereditarias, incluido el retraso mental ligado al cromosoma X.

Además, los anticuerpos anti-IL-1R1 o las composiciones farmacéuticas de la invención son útiles para tratar lesiones del sistema nervioso central (SNC), incluidos los efectos de los neurotransmisores neurotóxicos liberados durante la excitación de la inflamación en el sistema nervioso central y para inhibir o prevenir el desarrollo de cicatrices gliales en sitios de lesiones del sistema nervioso central. En relación con la epilepsia y el tratamiento de las convulsiones, reducción de la gravedad y el número de convulsiones recurrentes y reducción de la gravedad de los efectos perjudiciales de las convulsiones, reducción de la pérdida neuronal, degeneración neuronal y gliosis asociada con convulsiones.

Usos adicionales para los anticuerpos o composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, pero no se limitan a tratar la polineuropatía y miopatía de enfermedad crítica (CIPNM), polineuropatía aguda, anorexia nerviosa; parálisis de Bell; síndrome de fatiga crónica; demencia transmisible, incluida la enfermedad de Creutzfeld-Jacob, neuropatía desmielinizante, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de disco vertebral, síndrome de la Guerra del Golfo, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, miastenia grave; isquemia cerebral silente; trastornos del sueño, incluida narcolepsia y apnea del sueño; degeneración neuronal crónica y apoplejía, incluidas enfermedades isquémicas cerebrales. Todavía usos adicionales para los anticuerpos de la invención son anorexia y/o trastornos anoréxicos, peritonitis, endotoxemia y choque séptico, formación de granuloma, apoplejía cardíaca, síndrome de Churg-Strauss, inflamación crónica tras infecciones agudas tales como tuberculosis y lepra, esclerosis sistémica y cicatrización hipertrófica.

En otras realizaciones, las proteínas de fusión con avidina que comprenden una secuencia de aminoácidos de uno de los anticuerpos IL-1R1 de la invención se pueden construir para diversos fines. Las proteínas de fusión con avidina se pueden generar usando, por ejemplo, un vector de expresión en mamíferos que contiene la secuencia de ADNc que codifica la avidina de pollo recombinante adyacente a un sitio de clonación múltiple para inserción de un participante en la fusión génica diana específico. El vector puede incluir una secuencia de avidina con su secuencia señal endógena para permitir la secreción de participantes génicos de fusión discretos que no contienen secuencias señal de forma natural. La proteína de fusión expresada por el vector tiene una marca de la proteína avidina en la parte N-terminal del

participante en la fusión. La estrategia de fusión, como se ha descrito en esta memoria, tiene la capacidad de secretar proteínas que se expresan normalmente de modo intracelular, tal como genes de transducción de señal o receptores de hormonas nucleares.

5 Alternativamente, se puede usar un vector que codifica avidina sin su secuencia señal endógena, lo que tendrá como resultado una marca en C-terminal de los participantes en las proteínas de fusión. Una fusión de avidina en el extremo C permite la secreción de proteínas en base a la secuencia señal endógena del participante en la fusión. Una estrategia de este tipo se puede aplicar para permitir el correcto procesamiento y plegamiento de la proteína o para determinar la validez de una secuencia señal propuesta. Adicionalmente, el vector puede comprender una secuencia nucleotídica
10 corta que codifica una secuencia de aminoácidos que puede actuar como sustrato específico escindible por enzimas entre la avidina y las secuencias del participante en la fusión. Dichas secuencias escindibles por enzimas permiten la separación del participante en la fusión de la avidina para la purificación o con fines de liberación de la proteína.

15 Las proteínas de fusión con avidina de la invención se pueden usar, por ejemplo, en el rastreo de anticuerpos, caracterización funcional (determinación de la utilidad de un anticuerpo como agonista o antagonista, agente neutralizante etc.), representación en mapa de epítomos o estrategias de inmunización. Las fusiones con avidina de una proteína diana también se pueden usar en formatos de ensayos farmacocinéticos, de eficacia u otros formatos de ensayo convencionales, diseñados para analizar las muestras preclínicas o las muestras de pacientes clínicos por la presencia del anticuerpo terapéutico en sangre, orina u otras muestras de tejido. Los participantes en las proteínas de
20 fusión con avidina se pueden preparar como secuencias de longitud completa o truncadas, dominios estructurales aislados específicos o como secuencias quiméricas con otros homólogos del participante en la fusión de otras especies.

25 Las proteínas de fusión con avidina se pueden expresar usando medios estándares de introducir genes en células, como se ha descrito en esta memoria y como se conoce en la técnica. Las proteínas se pueden expresar, por ejemplo, en células 293 o CHO transfectando las células con una construcción de la fusión de avidina en una disolución de lípidos, tal como en lipofectamina (Invitrogen, Carlsbad, CA).

30 Los medios acondicionados y/o lisados celulares de células que expresan las proteínas de fusión se pueden recoger y aplicar a un sustrato de ensayo, tal como perlas de poliestireno recubiertas con biotina o placas ELISA revestidos con biotina. La recolección del medio acondicionado y/o el lisado celular se puede realizar en un instante que permita la expresión óptima de la proteína de fusión. Los expertos en la técnica pueden determinar experimentalmente el instante, pero normalmente es de aproximadamente 48 horas tras la transfección. Las proteínas de fusión también se pueden analizar en la membrana celular o intracelularmente para la expresión y funcionalidad en la unión de ligandos, receptores o anticuerpos conocidos.
35

Las proteínas de fusión con avidina de la invención se pueden analizar mediante cualquier método conocido o previamente caracterizado que utiliza interacciones biotina-avidina. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a citometría de flujo y pruebas de imagen fluorescente/microscopía. Por ejemplo, las proteínas de fusión con avidina expresadas en medios o lisados celulares se pueden aplicar a perlas recubiertas con biotina y se pueden tefir con anticuerpos anti-avidina marcados con fluorescencia para indicar el nivel de expresión. También se pueden aplicar anticuerpos fluorescentes que reconocen el participante de la proteína de fusión específica en un formato de ensayo multicolorimétrico. Adicionalmente, los anticuerpos no marcados específicos para el participante de la proteína de fusión se pueden aplicar de forma simultánea con anticuerpos marcados con fluorescencia en un ensayo de competición.
40

45 En determinadas realizaciones, la invención proporciona métodos para representar en mapa los epítomos usando proteínas de fusión con avidina. Más adelante se proporciona un ejemplo de un método para representar en mapa los epítomos de la invención con respecto a la representación en mapa de epítomos para anticuerpos anti-IL-1R1. Sin embargo, un experto en la técnica reconocerá que dichos métodos se pueden aplicar fácilmente para representar en mapa los epítomos para cualquier anticuerpo y no está limitado a los anticuerpos anti-IL-1R1. Por ejemplo, el ADNc que codifica avidina de pollo (con secuencia señal endógena) se puede unir con el extremo 5' de ADNc que codifican una proteína de interés (*es decir*, una proteína reconocida por los anticuerpos para los cuales se desea determinar un epítomo) condensada a una secuencia marcadora FLAG en el extremo 3'. Los genes de fusión marcados con FLAG se pueden ensamblar en un vector de expresión utilizando técnicas moleculares convencionales. Un panel de proteínas mutantes marcadas con avidina-FLAG en las que se han sustituido determinados aminoácidos (*p. ej.*, con los correspondientes residuos de aminoácidos de otras especies animales) se pueden generar utilizando técnicas convencionales. Las proteínas mutantes y de tipo salvaje se pueden expresar en células hospedadoras y la unión de las proteínas mutantes y de tipo salvaje con un anticuerpo de interés se pueden detectar usando, por ejemplo, análisis de transferencia Western o ensayos de unión basados en perlas, tal como se describe en esta memoria. Por tanto, un epítomo se puede definir determinando qué sustituciones en las proteínas mutantes destruyen la unión al anticuerpo de interés.
50
55
60

EJEMPLOS

65 Los ejemplos siguientes, incluidos los experimentos realizados y los resultados alcanzados se proporcionan con fines ilustrativos únicamente y no deben interpretarse como limitantes de la invención.

Ejemplo 1**Producción de anticuerpos monoclonales humanos contra el receptor tipo 1 de la interleucina 1 (IL-1R1)****5 Ratones HuMab transgénicos**

Anticuerpos monoclonales completamente humanos contra el receptor de tipo 1 de IL-1 (IL-1R1) se prepararon utilizando la cepa HCo7 de ratones transgénicos, que expresa genes de anticuerpos humanos. En cada una de estas cepas de ratones, el gen endógeno de la cadena ligera kappa de ratón ha sido alterado de forma homocigótica como se describe en Chen *et al.* (1993, *EMBO J.* 12:811 -820) y el gen endógeno de la cadena pesada de ratón ha sido alterado de forma homocigótica como se describe en el Ejemplo 1 de la publicación de solicitud de patente internacional nº WO 01/09187. Cada una de estas cepas de ratón porta un transgen de la cadena ligera kappa humana, KCo5, tal como se describe en Fishwild *et al.* (1996, *Nature Biotechnology* 14:845-851). La cepa HCo7 porta el transgen de la cadena pesada humana de HCo7 como se describe en las Patentes de EE.UU. nºs 5.545.806; 5.625.825; y 5.545.807. A la cepa HCo7 se la alude en esta memoria como ratones HuMab.

Inmunizaciones con HuMab

Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos contra IL-1R1 se inmunizó a los ratones HuMab con IL-1R1 recombinante purificado derivado de células de insecto o de mamífero (por ejemplo, células CHO) como antígeno. Los esquemas de inmunización general para ratones HuMab se describen en Lonberg *et al.* (1994, *Nature* 368:856-859; Fishwild *et al.*, *supra*; y la publicación de solicitud de patente internacional nº WO 98/24884. Los ratones tenían 6-16 semanas de edad tras la primera infusión del antígeno. Un preparado recombinante purificado (25-50 µg) del antígeno IL-1R1 (*p. ej.*, purificado de células de insecto o de mamífero transfectadas que expresan IL-1R1) se utilizó para inmunizar los ratones HuMab por vía intraperitoneal (IP) o subcutánea (SC).

Las inmunizaciones de ratones HuMab transgénicos se realizaron utilizando antígeno en adyuvante completo de Freund y dos inyecciones, seguido de 2-4 semanas de inmunización IP (hasta un total de 11 inmunizaciones) con el antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Varias docenas de ratones se inmunizaron para cada uno de los antígenos. Se inmunizó a un total de 149 ratones de la cepa HCo7 con IL-1R1. La respuesta inmunitaria se monitorizó mediante sangrados retro-orbitales.

Para seleccionar los ratones HuMab productores de anticuerpos que se unieron a IL-1R1 se analizaron los sueros de ratones inmunizados mediante ELISA tal como se describe por Fishwild *et al.*, *supra*. En síntesis, placas de microtitulación se revistieron con IL-1R1 recombinante purificado de células de insecto o de mamífero a razón de 1-2 µg/mL en PBS y 50 µL/pocillo incubadas a 4 °C durante una noche, después se bloquearon con 200 µL/pocillo de suero de pollo al 5 % en PBS/Tween (0,05 %). A cada uno de los pocillos se añadieron diluciones de plasma de ratones inmunizados con IL-1 R1 y se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/Tween y después se incubaron con reactivo policlonal específico para Fc de IgG ANTI-humana de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/Tween y después se incubaron con un reactivo policlonal específico de Fc de IgG ANTI-humana de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar, las placas se desarrollaron con sustrato ABTS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Nº de Catálogo A-1888, 0, 22 mg/mL) y se analizaron espectrofotométricamente a una DO de 415-495. Los ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana antiIL-1R1 se utilizaron para producir anticuerpos monoclonales como se describe más adelante.

Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos contra IL-1 R1

Los ratones se prepararon para la producción de anticuerpos monoclonales reforzando con antígeno por vía intravenosa 2 días antes del sacrificio y, después, se extrajeron los bazo. Los esplenocitos de ratón se aislaron de los ratones HuMab y se condensaron con PEG a una línea celular de mieloma de ratón usando protocolos estándares. Típicamente se realizaron 20-30 fusiones para cada antígeno.

En síntesis, suspensiones celulares simples de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados se condensaron a un cuarto del número de P3X63-Ag8.653 células de mieloma de ratón no secretoras (nº de acceso en la A.T.C.C., CRL 1580) o células de mieloma de ratón no secretoras SP2/0 (A.T.C.C., CRL 1581) conPEG al 50% (Sigma). Las células se sembraron a aproximadamente 1x10⁵/pocillo en placas de microtitulación de fondo plano, seguido de aproximadamente una incubación durante dos semanas en medio selectivo que contiene suero bovino fetal al 10 %, medio acondicionado P388D1 (nº de acceso en la A.T.C.C., CRL TIB-63) al 10 %, origen (IGEN) en DMEM al 3-5 % (Mediatech, Nº de Catálogo CRL 10013, con alto contenido en glucosa, L-glutamina y piruvato sódico) más HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 mg/mL de gentamicina y 1x HAT (Sigma, nº de Catálogo CRL P-7185). Tras 1-2 semanas se cultivaron las células en medio en el que HAT se había sustituido por HT.

Los hibridomas resultantes se rastrearon en cuanto a la producción de anticuerpos específicos para antígeno. Los pocillos individuales se rastrearon mediante ELISA (descrito anteriormente) para anticuerpos IgG monoclonales anti-IL-1R1 humanos. Una vez producido un crecimiento extenso del hibridoma, el medio normalmente se monitorizó tras 10-

14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpos se volvieron a sembrar, se volvieron a someter a rastreo y, si siguen siendo positivos para IgG humana, los anticuerpos monoclonales anti-IL-1 R1 se subclonaron al menos dos veces mediante dilución l imitante. Los subclones estables se cultivaron despu es *in vitro* para generar cantidades pequeñas de anticuerpo en medio de cultivo tisular para la caracterización.

5 Selección de anticuerpos monoclonales anti-IL-1R1 humanos

10 Para el rastreo de hibridomas que mostraron reactividad positiva con el inmunógeno IL-1R1 se utilizó un ensayo ELISA como se ha descrito antes. Los hibridomas secretores de un anticuerpo monoclonal unido con avides elevada a IL-1R1 se subclonaron y se caracterizaron adicionalmente. Un clon de cada uno de los hibridomas, que retuvo la reactividad de las c elulas parentales (determinado mediante ELISA) se escogió para hacer un banco celular de 5-10 viales almacenado en n itr geno líquido.

15 Se realizó un ELISA específico para el isotipo para determinar el isotipo de los anticuerpos monoclonales producidos como se describe en esta memoria. En estos experimentos, los pocillos de las placas de microtitulación se revistieron con 50  L/pocillo de una disolución de 1  g/mL de la cadena ligera kappa anti-humana de ratón en PBS y se incubaron a 4  C durante una noche. Después de bloquear con suero de pollo al 5 %, las placas se hicieron reaccionar con sobrenadante de cada uno de los anticuerpos monoclonales analizado y un isotipo control purificado. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1-2 horas. Después, los pocillos se hicieron reaccionar con antisuero policlonal anti-humano de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante específico para IgG 1, IgG2 o IgG4 humanas y las placas se desarrollaron y analizaron como se describe más adelante.

25 Anticuerpos monoclonales purificados de los sobrenadantes de hibridoma que mostraban una unión significativa a IL-1R1 detectado mediante ELISA se analizaron adicionalmente en cuanto a su actividad biológica utilizando ensayos de unión *in vitro* y ensayos basados en c elulas de sangre entera y condrocitos humanos. Se diseñaron los anticuerpos que mostraron la mejor actividad 15C4, 26F5, 27F2, 24E12 y 10H7. Los anticuerpos se sometieron a un experimento preliminar de clasificación de epítopos. Las placas de ELISA se revistieron con sIL-1R1 humano (dominio 1+2+3), sIL-1R1 humano truncado (dominio 1+2), sIL-1R1 de rata, sIL-1R1 de tipo II humano y ovoalbúmina (control negativo). La unión del anticuerpo se detectó con un anticuerpo Fc anti-humano conjugado con peroxidasa de rábano picante (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Los resultados se resumen en la Tabla 2. Una marca de comprobación ( ) en la Tabla 2 representa un resultado positivo para la unión; "X" representa un resultado negativo. Los anticuerpos 15C4, 26F5, 27F2 y 24E12 sólo se unen a la proteína IL-1R1 que tiene los tres dominios extracelulares, lo que indica que los epítopos para cada uno entran dentro del tercer dominio. El anticuerpo 10H7 se une tanto al dominio extracelular de longitud completa IL-1R1 como también a una proteína truncada que solo tiene los dominios 1 y 2, demostrando que el epítopo para este anticuerpo están dentro del dominio 1 o 2. Ninguno de los anticuerpos analizados tiene reactividad cruzada con el receptor de tipo II humano o IL-1R1 de rata.

Tabla 2

Anticuerpo	OA (Control Negativo)	Hu sIL-1 R1 (Dominio 1+2+3)	Hu sIL-1 R1 (Dominio 1+2)	Hu sIL-1 RII (Dominio 1+2+3)	sIL-1 R1 (Dominio 1+2+3) de rata
15C4	X	�	X	X	X
28F5	X	�	X	X	X
27F2	X	�	X	X	X
24E12	X	�	X	X	X
10H7	X	�	�	X	X

40 **Ejemplo 2**

Inhibición *in vitro* de la formación del complejo del receptor de IL-1 de tipo I por anticuerpos anti-IL-1R1

45 La capacidad de los anticuerpos de inhibir los fenómenos de unión extracelular requeridos para la señalización de IL-1 se evaluó con proteínas recombinantes *in vitro* en un ensayo en el que la unión de IL-1 a IL-1R da lugar a la formación de un sitio de unión de alta afinidad para IL-1RAcP. La unión de IL-1RAcP a IL-1 unida a IL-1R (a lo que se alude como "formación de complejo") se mide como sigue. Las proteínas recombinantes se incubaron en ensayos de unión en placas de microtitulación en ausencia (control) o presencia de anticuerpos. Los valores de CI₅₀ se derivaron de las comparaciones de los valores control con los valores obtenidos en presencia del anticuerpo a concentraciones entre 10 fM y 1  M. En síntesis, el ensayo se realizó como sigue: IL-1R1 biotinilado y perlas recubiertas con estreptavidina

(DynaL, Dynabeads M-28) se dispensaron en placas de microtitulación. Después se añadió anticuerpo a los pocillos adecuados en una dilución en serie que cubre un amplio intervalo de concentraciones. Se añadió IL-1 β o IL-1 α a una concentración de 1 nM y se añadió IL1RAcP marcado con rutenio (preparado con NHS-Tag (IGEN) de acuerdo con los protocolos IGEN) a una concentración final de 5 nM. Tras incubación durante 1 hora a temperatura ambiente, la reacción de unión se analizó con un instrumento ORIGEN™ 1.5 o M8 (IGEN International Inc.). La unión de IL-1RAcP a IL-1 unida a IL-1R1 se determinó detectando la señal de electroquimioluminiscencia asociada con las perlas unidas a IL-1R1. La reducción de la señal resultante de la competición del anticuerpo de la unión de IL-1 o IL-1RAcP se calculó como porcentaje de la señal ECL para la unión máxima (sin competición).

Se estableció la curva de respuesta de inhibición para cada uno de los anticuerpos en estos ensayos de unión y las CI_{50} se derivaron usando el software PRISM™. Los resultados de la inhibición de fenómenos de unión inducidos por IL-1 β se representan en el gráfico en la Figura 12. Los valores de CI_{50} para la inhibición de la formación del complejo se muestran en la Tabla 3 a continuación. Los anticuerpos 15C4, 26F5, 27F2 y 24E12 inhiben fuertemente la formación del complejo. Estos anticuerpos son todos ellos ligandos del tercer dominio de IL-1R1, como se ha descrito anteriormente. El anticuerpo 10H7 pertenece a una clase de anticuerpos que se une a una construcción del IL-1 R que carece del tercer dominio. 10H7 es un inhibidor menos potente de la unión dirigida por IL-1 de IL-1RAcP que los ligandos del tercer dominio. La inhibición de la formación del complejo por los anticuerpos de la invención se comparó con la inhibición por IL-1ra. Los ligandos del tercer dominio demostraron una capacidad similar o ligeramente superior para inhibir la formación del complejo mediante comparación con IL-1ra.

La Figura 13 representa la capacidad del anticuerpo 15C4 para inhibir la formación del complejo IL-1R1/IL-1a/RAcP. La CI_{50} para la formación del complejo IL-1R1/IL-1a/RAcP fue 43 pM.

Tabla 3

	Anti-IL-1R1 Humano					
	15C4	26F5	27F2	24E12	10H7	rIL-1ra
CI_{50}	96 pM	160 pM	333 pM	348 pM	53 pM	555 pM
Límite de confianza 95%	71 pM a 129 pM	118 pM a 219 pM	214 pM a 517 pM	223 pM a 542 pM	3,6 nM a 7,5 nM	414 pM a 743 pM

Ejemplo 3

Anticuerpos Anti-IL-1 R1 inhiben la unión de IL-1 β e IL-1ra al receptor

La capacidad de los anticuerpos anti-IL-1R1 para inhibir la IL-1 β o IL-1ra a IL-1R1 se evaluó en un ensayo con proteínas recombinantes. La mezcla de reacción contenía 0, 1 mg/mL de Dynabeads M-280 Streptavidin (DynaL) y IL-1R1 biotinilado 1 nM. Los anticuerpos se añadieron a concentraciones de 320 nM a 0,3 nM. La adición de IL-1 β (5 nM) o IL-1ra (1 nM) marcados con rutenio inició la unión que prosiguió durante 1 hora a temperatura ambiente. Las mezclas de reacción se midieron como antes usando un instrumento ORIGEN™ 1.5 o M8 (IGEN International Inc.). La competición se calculó como el porcentaje de la señal ECL para la unión máxima (sin competición). Los anticuerpos 15C4, 26F5 y 27F2, los anticuerpos más potentes, bloquean la unión del ligando (IL-1 β) al receptor, pero no interfieren significativamente con la unión de IL-1ra en comparación con IgG control. En contraste, el anticuerpo 24E12 se une al receptor pero no bloquea la unión de IL-1 β o de IL-1ra al receptor. Por lo tanto, el anticuerpo 24E12 representa una clase única de ligandos del tercer dominio distintos de la clase representada por 15C4, 26F5 y 27F2. El anticuerpo 10H7 inhibe la unión tanto de IL-1 β como de IL-1ra al receptor. Los resultados se resumen en la Figura 14.

Ejemplo 4

Ensayos en condrocitos y sangre entera humana

Condrocitos humanos primarios (Cell Applications Inc., San Diego, CA) se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células/pocillo en medio DMEM que contenía FBS al 1 % y Pen Strep al 1% (GIBCO). Se dejó que las células se recuperaran durante una noche antes de la adición de anticuerpos anti-IL-1R1 a concentraciones que oscilan entre 10 nM y 0,1 pM durante 20 minutos. Se añadió IL-1 β a una concentración de 1 pM (~ CE_{50}) y los sobrenadantes de los cultivos se recogieron tras 16 horas de incubación a 37°C. Los niveles de IL-6 en el sobrenadante se midieron utilizando un ELISA (Pierce-Endogen, Rockford, IL, nº de cat. EH2IL-65) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se estableció la curva de respuesta de inhibición para cada uno de los anticuerpos de la invención en los ensayos basados en células y los valores de CI_{50} se derivaron usando el software PRISM™. Los anticuerpos 15C4, 26F5 y 27F2 son potentes inhibidores de la señalización de IL-1 en comparación con IL-1ra (Figura 15A). Los anticuerpos 24E12 y 10H7 son acusadamente menos potentes que 15C4 y 27F2 (Figura 15B). Los valores de CI_{50} para la inhibición de la producción de IL-6 inducida por IL-1 β en condrocitos humanos se muestran en las Tablas 4A y 4B. (correspondientes a las Figuras 15A y 15B, respectivamente).

Los anticuerpos monoclonales anti-IL-1R1 15C4, 26F5 y 27F2 se preincubaron durante 40-60 minutos con sangre

entera humana recogida de voluntarios sanos en Vacutainers con heparina sódica. Los ensayos se realizaron como se indica a continuación: 100 μ L de sangre recién aislada se repartieron en partes alícuotas en pocillos de una placa de 96 pocillos. 50 μ L del anticuerpo se añadieron en medio RPMI que contiene suero AB humano al 10 %. Después se añadió IL-1 β a una concentración de 30 pM (CE_{50}). Los sobrenadantes del cultivo se recogieron tras 18 horas y se midieron los niveles de IL-6 en el sobrenadante usando un ELISA. Como control, IL-1ra se preincubó durante 40-60 minutos con sangre entera y la producción de IL-6 se midió como se ha indicado antes. Los tres anticuerpos anti-IL-1R1 bloquearon la actividad de IL-1 con una potencia comparable a la de IL-1ra (Figura 16). Los valores de CI_{50} para la inhibición de la producción de IL-6 inducida por IL-1 en sangre entera se muestran en la Tabla 5.

Tabla 4A

	Anticuerpos anti-IL-1 R1 humanos			
	15C4	27F2	26F5	rIL-1ra
CI_{50}	16 pM	32 pM	26 pM	32 pM
Límite de confianza 95%	15 pM a 18 pM	21 pM a 49 pM	19 pM a 36 pM	22 pM a 46 pM

Tabla 4B

	Anticuerpos anti-IL-1 R1 humanos				
	15C4	27F2	10H7	26F5	rIL-1ra
CI_{50}	7 pM	28 pM	7,5 pM	ND	20 pM
Límite de confianza 95%	5,8 pM a 7,9 pM	22 pM a 35 pM	5,6 nM a 10 nM	ND	17 pM a 23 pM

Tabla 5

Donante	Parámetros de Análisis	15C4	26F5	27F2	IL-1ra
1047	CI_{50}	126 pM	410 pM	249 pM	241 pM
	Límite de confianza 95%	47 pM a 339 pM	213 pM a 790 pM	88 pM a 703 pM	124 pM a 471 pM
1319	CI_{50}	111 pM	174 pM	579 pM	381 pM
	Límite de confianza 95%	59 pM a 208 pM	60 pM a 501 pM	249 pM a 1,3 nM	167 pM a 875 pM
Material compuesto	CI_{50}	126 pM	372 pM	387 pM	264 pM
(Datos agrupados)	Límite de confianza 95%	62 pM a 255 pM	187 pM a 739 pM	202 pM a 748 pM	134 pM a 517 pM

Ejemplo 5

Mutagénesis y representación en mapa de epítomos

La mutagénesis dirigida al sitio (Altered Sites® In Vitro Mutagenesis System, Promega, Madison WI) de IL-1R1 se usó para preparar un panel de proteínas mutantes ("muteínas"), en las que los residuos de aminoácidos de rata se sustituyeron por la correspondiente secuencia humana. Se construyeron quince plásmidos mutados diferentes (véanse las barras numeradas en la Figura 17). Los plásmidos que codifican estas proteínas sustituidas y el IL-1 R1 parental se transfectoron de forma transitoria en células CHO. Los transfectantes simulados se generaron como controles negativos. El medio acondicionado (CM) de estas células se concentró ~ 20 veces utilizando las columnas de concentración Centriprep 10 (Amicon) La expresión de las muteínas se evaluó mediante SDS-PAGE y transferencia Western. Se expresaron trece proteínas mutantes a niveles que permitieron la evaluación de la unión del anticuerpo. Las proteínas se cargaron en un gel, se sometieron a electroforesis y se transfirieron a membranas. Las membranas se bloquearon en 1 % de leche en PBS, Tween-20 al 0, 1 % y después se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos anti-IL-1R 15C4, 27F2 o 24E12 a 0,5 μ g/mL en PBS, Tween-20 al 0,1 %. Tras lavar, las membranas se incubaron con IgG-Fc-HRP anti-humana de cabra. La señal se detectó usando sustrato de quimioluminiscencia (ECL) (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Las secuencias específicas humanas críticas para la unión de anticuerpos se identificaron como aquéllas que, cuando se sustituyeron con secuencias de rata, redujeron o eliminaron la señal ECL. El reconocimiento de 15C4 de los mutantes 1, 2, 4 y 10 se alteró cuando se comparó con 24E12 (Figura 18, panel superior). De forma similar, la unión de 27F2 a los mutantes 1, 2 y 4 se alteró (Figura 18, panel central). 24E12 no tuvo ninguna unión significativa a los mutantes 12, 13, 14 y 15 (Figura 18, panel inferior).

El aislamiento y la caracterización de los anticuerpos anti-IL-1R1 humanos han identificado tres clases distintas de

anticuerpos competitivos (Figura 19). Los inhibidores más fuertes de la actividad biológica de IL-1, como se demuestra en bioensayos basados en células, son los anticuerpos que se unen al tercer dominio de IL-1R1 y previenen la asociación de IL-1 β . Los experimentos de representación en mapa del epítipo usando un panel de proteínas mutantes en el tercer dominio han demostrado que esta clase de anticuerpos, que incluye 15C4, 27F2 y 26F5, comparte un epítipo conformacional solapante pero no idéntico. Las Figuras 20 y 21 ilustran la posición de los epítopos de 15C4 en el tercer dominio del receptor de IL-1, en un diagrama de cinta de un receptor de IL-1 unido a IL-1ra (Schreuder *et al.*, 1997, *Nature* 386:194-200). Los residuos del receptor de IL-1 que definen la unión de la clase más potente de anticuerpos se ilustran en gris. Estos anticuerpos han demostrado una potencia superior y, por tanto, estos epítopos definen sitios de unión para anticuerpos de una clase superior. Los sitios de unión de 15C4 y 27F2 son solapantes, pero no idénticos, según se determina por el análisis mutacional de los 15 sitios diferentes dentro de IL-1R1 descrito anteriormente. Los sitios se representan en la Figura 17 como las barras numeradas encima de la secuencia de la proteína. Los sitios de interacción críticos parecen estar dentro de las mutaciones en los sitios 1 (LSDIA; SEQ ID NO: 41), 2 (VIDE; SEQ ID NO: 42), 4 (YSV) y 10 (TCFA; SEQ ID NO: 43). Los sitios de unión de 15C4 y 27F2 están comprendidos dentro de los sitios 1 y 2, ya que la sustitución de los residuos de rata para los residuos humanos en cualquiera de los sitios anula la unión. 27F2 difiere de 15C4 en que los cambios en el sitio 4 anulan completamente su unión, mientras que la unión de 15C4 se reduce pero no se elimina completamente. La mutación 10 también reduce la unión de 15C4, pero 27F2 no tienen ninguna interacción obvia con este sitio. El examen de la estructura cristalina revela que estos residuos definen una cara del tercer dominio que está orientada hacia el espacio ocupado por el ligando unido (Figuras 20 y 21) (Vigers *et al.*, 1997, *Nature* 386:190-194).

La segunda clase de anticuerpos identificados, representados por 10H7, no requiere el tercer dominio de unión y, al contrario que la clase preferida, inhibe la unión de IL-1ra. Esta clase es activa en bioensayos, pero es menos potente que la clase preferida.

En contraste con la fuerte inhibición de los bioensayos de IL-1 con la clase preferida de anticuerpos, 24E12 es un inhibidor ineficaz en bioensayos. El anticuerpo 24E12 inhibe la unión de IL-1RAcP con IL-1 unida a IL-1R. El epítipo para esta clase de anticuerpos, definido por los mutantes 12, 13, 14 y 15, está proximal al dominio transmembrana de IL-1R1 y está en una región no implicada directamente en la unión de IL-1 o de IL-1ra (Figura 22).

Ejemplo 6

Clonación de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-IL1-R1

Clonación de la cadena ligera del MAb 15C4 anti-IL1-R1

Las cadenas ligeras de tres hibridomas que expresan los anticuerpos monoclonales de unión a IL1-R1, 15C4, 27F2 y 26F5, se clonaron en el vector de expresión de células de mamífero pDSR α 19 (véase la publicación de solicitud internacional nº WO 90/14363. La construcción del plásmido que codifica la cadena ligera kappa de 15C4 se describe explícitamente en esta memoria; la clonación de la otra especie de cadena ligera se realizó utilizando procesos similares. La región variable de la cadena ligera kappa de α IL-1 R1 se obtuvo utilizando métodos de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la primera cadena del ADNc preparado a partir del ARN total del hibridoma α IL-1R1 de 15C4 preparado usando el reactivo TRIzol® (Invitrogen). La primera cadena de ADNc se sintetizó usando un cebador aleatorio con un adaptador de extensión (5'-GGC CGG ATA GGC CTC CAN NNN NNT -3'; SEQ ID NO: 44) y un 5' RACE (amplificación rápida de los extremos del ADNc) se realizó usando el kit GeneRacer™ (Invitrogen). Para la cadena ligera completa, el cebador directo era el cebador anidado GeneRacer™ (5' GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA -3'; SEQ ID NO: 45) y el cebador inverso era 5'-GGG GTC AGG CTG GAA CTG AGG -3' (SEQ ID NO: 46). Los productos de RACE se clonaron en pCR4-TOPO (Invitrogen) y se determinaron las secuencias de ADN. La secuencia del ADN consenso de la cadena kappa de 15C4 se usó para diseñar cebadores para la amplificación por PCR del anticuerpo de longitud completa. El cebador de PCR de la cadena kappa 5' codificó el extremo amino de la secuencia señal y un sitio para la enzima de restricción XbaI y una secuencia Kozak optimizada (5'-CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GTC GCC ATC ACA ACT CTA GAC CAC CAT GTC GCC ATC ACA ACT CAT TGG G -3'; SEQ ID NO: 47). El cebador 3' codificó el extremo carboxilo y el codón de terminación, así como un sitio de restricción Sall (5'-CTT GTC GAC TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT C -3'; SEQ ID NO: 48).

cebador de la cadena kappa 5' α IL-1R1 15C4 (SEQ ID NO: 47):

5'- CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GTC GCC ATC ACA ACT

XbaI Kozak M S P S Q L

CAT TGG G -3'

I G (SEQ ID NO: 49)

cebador de la cadena kappa 3' α IL-1R1 15C4 (SEQ ID NO: 48):

5'- CTT GTC GAC TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT C -3'

SalI * C E G R N F S (SEQ ID NO: 50)

5 El clon de la cadena kappa de longitud completa de α L-1R1 15C4 se obtuvo usando el clon pCR4:15C4 kappa mediante amplificación por PCR con los cebadores de la cadena kappa de 15C4 de α L-1R1 5' y 3'. La reacción PCR generó un producto de 733 pares de bases que codifica los 233 residuos de aminoácidos (incluida la secuencia señal de la cadena kappa de 19 aminoácidos) de la región variable de la cadena kappa de α L-1R1 15C4. El producto de la amplificación con PCR se purificó usando un kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen N° de Catálogo 28104), se cortó con *Xba*I and *Sal*I, se aisló en gel y se purificó usando un kit de extracción QIAquick Gel (Qiagen n° de Catálogo 28704). Este fragmento de PCR que contiene la cadena kappa completa α L-1R1 15C4 se ligó después en el vector de expresión de mamíferos pDSR α 19. El clon de expresión de la cadena kappa de 15C4 se secuenció con ADN para confirmar que codificaba el mismo péptido que se identificó en el hibridoma 15C4. El vector de expresión final, pDSR α 19:15C4 kappa, tiene 5468 pares de bases y contiene las siete regiones funcionales que se describen en la Tabla 6.

Tabla 6

15 Número de pares de bases del plásmido

2 a 881	Una señal de terminación de la transcripción/poliadenilación de la subunidad α de la hormona glicoproteica de la hipófisis bovina (α -FSH) (Goodwin et al., 1983, <i>Nucleic Acids Res.</i> 11:6873-82; Número de acceso Genbank X00004)
882 a 2027	Un minigen de dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón que contiene el promotor de DHFR endógeno de ratón, las secuencias codificadoras de ADNc y las señales de terminación de la transcripción/poliadenilación DHFR (Gasser et al., 1982, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 79:6522-6; Nunberg et al., 1980, <i>Cell</i> 19: 355-64; Setzer et al., 1982, <i>J. Biol. Chem.</i> 257:5143-7; McGrogan et al., 1985, <i>J. Biol. Chem.</i> 260: 2307-14)
2031 a 3947	Secuencias de pBR322 que contienen el gen marcador de resistencia a ampicilina y el origen de replicación del plásmido en <i>E. coli</i> (Número de acceso Genbank J01749)
3949 a 4292	Un promotor temprano de SV40, potenciador y origen de replicación (Takebe et al., 1988, <i>Mol. Cell Biol.</i> 8: 466:-72; Número de acceso Genbank J02400)
4299 a 4565	Un elemento potenciador de la traducción del dominio LTR de HTLV-1 (Seiki et al., 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 80:3618-22, Número de acceso Genbank J02029)
4574 a 4730	Un intrón de SV40 16S, 19S, señales de corte y empalme de donante/aceptor (Okayama y Berg, 1983, <i>Mol. Cell Biol.</i> 3:280-9; Número de acceso Genbank J02400)
4755 a 5468	El ADNc de IgG1, cadena ligera de 15C4, entre los sitios <i>Xba</i> I y <i>Sal</i> I

20 **Construcción de pDSR19:hlgG1C_H**

Se construyó un plásmido de expresión pDSR α 19:región variable de rata/región constante humana IgG1 (rVh/hCh1) de MAb como resultado de un ligamiento de tres trozos del producto de la PCR de la región variable de anticuerpos de rata terminada con *Xba*I and *Bsm*BI, la región constante de IgG1 humana (dominios C_{H1}, bisagra, C_{H2} y C_{H3}) derivada por escisión con *Sal*I y aislamiento en gel del fragmento de *Bsm*BI y *Sal*I del plásmido lineal pDSR α 19:hlgG1 CH (extremos *Hind*III y *Bsm*BI) y un pDSR α 19 linearizado con extremos *Xba*I y *Sal*I (véase la solicitud de patente provisional de EE.UU. de propiedad conjunta y pendiente de tramitación n° 60/370. 407, presentada el 5 de abril de 2002, "Human Anti-OPGL Neutralizing Antibodies As Selective OPGL Pathway Inhibitors", incorporada como referencia). El vector de expresión final pDSR α 19:región variable de rata/Región constante humana IgG1 (rVh/hCh1), tiene 6158 pares de bases y contiene las 7 regiones funcionales que se describen en la Tabla 7.

Tabla 7

Número de pares
de bases del plásmido

2 a 881	Una señal de terminación de la transcripción/poliadenilación de la subunidad α de la hormona glicoproteica de la hipófisis bovina (α -FSH) (Goodwin <i>et al.</i> , 1983, <i>Nucleic Acids Res.</i> 11 :6873-82; Número de acceso Genbank X00004)
882 a 2027	Un minigen de dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón que contiene el promotor de DHFR endógeno de ratón, las secuencias codificadoras de ADNc y las señales de terminación de la transcripción/poliadenilación DHFR (Gasser <i>et al.</i> , 1982, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 79 :6522-6; Nunberg <i>et al.</i> , 1980, <i>Cell</i> 19 : 355-64; Setzer <i>et al.</i> , 1982, <i>J. Biol. Chem.</i> 257 :5143-7; McGrogan <i>et al.</i> , 1985, <i>J. Biol. Chem.</i> 260 : 2307-14)
2031 a 3947	Secuencias de pBR322 que contienen el gen marcador de resistencia a ampicilina y el origen de replicación del plásmido en <i>E. coli</i> (Número de acceso Genbank J01749)
3949 a 4292	Un promotor temprano de SV40, potenciador y origen de replicación (Takebe <i>et al.</i> , 1988, <i>Mol. Cell Biol.</i> 8 : 466-72; Número de acceso Genbank J02400)
4299 a 4565	Un elemento potenciador de la traducción del dominio LTR de HTLV-1 (Seiki <i>et al.</i> , 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 80 :3618-22, Número de acceso Genbank J02029)
4574 a 4730	Un intrón de SV40 16S, 19S, señales de corte y empalme de donante/aceptor (Okayama y Berg, 1983. <i>Mol. Cell Biol.</i> 3 :280-9; Número de acceso Genbank J02400)
4755 a 6158	El ADNc de la cadena pesada de hVh/hCh1, entre los sitios <i>Xba</i> I y <i>Sal</i> I Esta secuencia del fragmento de la cadena pesada se muestra más adelante (SEQ ID NO: 51) con las secuencias de los sitios de restricción subrayados: <i>Xba</i> I <u>TCTAG ACCACCATGG ACATCAGGCT CAGCTTAGTT TTCCTGTCC</u> <u>TTTTCATAAA AGGTGTCCAG TGTGAGGTAG AACTGGTGA</u> <u>GTCTGGGGGC GGCTTAGTAC AACCTGGAAG GTCCATGACA</u> <u>CTCTCCTGTG CAGCCTGGG ATTCACTTTC AGAACCTATG GCATGGCCTG</u> <u>GTCCGCCAG GCCCAACGA AGGGTCTGA GTGGGTCTCA</u> <u>TCAATTACTG CTAGTGGTGG TACCACCTAC TATCGAGACT CCGTGAAGGG</u> <u>CCGCTTCACT ATTTTATAGG ATAA TGCAA AAGTACCCTA TACCTGCAGA</u> <u>TGGACAGTCC GAGGTCTGAG GACACGGCCA CTTATTTCTG TACATCAATT</u> <i>Bsm</i> BI TCGGAATACT GGGGCCACGG AGTCATGGTC ACCGTCTCTA GTGCCTCCACCAAGGGCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC TCCTCCAAG AGCACTCTGGGGGCACAGC GGCCCTGGGC TGCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG GTGACGGTGT CGTGGAATC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTC CTACAGTCTT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAATCACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG AAAGTTGAGC CCAAATCTTG TGACAAAAT CACACATGCC CACCGTGCCC AGCACCTGAA CTCTGGGGG GACCGTCACT CTCTCTTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCCGACCC CTGAGGTAC ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGACCCCTGAGGTG AAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTACA ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCTCA CCGTCTGCA CCAGGACTGG CTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTG TCCAACAAAG CCTCCAGC CCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCGGGATG AGCTGAOCAA GAACCAGGTG AGCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACA CTACAAGACC ACGCTCCCG TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCTCT ATAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCACTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGTA <i>Sal</i> I AATGATAAGT CGAC

5 El plásmido lineal pDSR α 19:hlgG1C_H se preparó digiriendo el plásmido pDSR19:región variable de rata/región constante humana IgG1 con las enzimas de restricción *Xba*I y *Bsm*BI para separar la región variable de rata y se purificó utilizando el kit de Extracción de Gel QIAquick. El plásmido lineal pDSR α 19:hlgG1C_H, que contiene el dominio de la región constante de IgG1 humana de 1 kpb se utilizó para aceptar las regiones variables del anticuerpo anti-IL-1R1 derivadas de hibridoma.

Clonación de la cadena pesada del MAb 15C4 anti-IL1-R1

Las cadenas pesadas de diez hibridomas que expresan los anticuerpos monoclonales de unión a α IL1-R1, 15C4, 27F2

5 y 26F5, se clonaron en el vector de expresión de células de mamífero pDSRα19. La construcción del plásmido que codifica la cadena pesada de 15C4 se describe explícitamente; la clonación de la otra especie de cadena pesada se realizó usando procesos similares. La región variable de la cadena pesada de αL-1R1 15C4 se obtuvo usando métodos de amplificación por PCR de la primera cadena del ADNc preparada a partir del ARN total del hibridoma αL1-RI de 15C4 preparado usando el reactivo TRIzol®. La primera cadena de ADNc se sintetizó usando un cebador aleatorio con un adaptador de la extensión (5'-GGC CGG ATA GGC CTC CAN NNN NNT -3'; SEQ ID NO: 44) y un 5' RACE (amplificación rápida de los extremos del ADNc) se realizó usando el kit GeneRacer™. Para la cadena pesada de longitud parcial, el cebador directo era el cebador anidado GeneRacer™ (5' GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA -3'; SEQ ID NO: 45) y el cebador inverso era 5'-TGA GGA CGC TGA CCA CAC G -3' (SEQ ID NO: 52). Los productos de RACE se clonaron en pCR4-TOPO y se determinaron las secuencias de ADN. La secuencia del ADN consenso de la región variable de la cadena pesada de 15C4 se utilizó para diseñar cebadores para la amplificación por PCR de la región variable de la cadena pesada. El cebador de PCR de la cadena pesada 5' codificó el extremo amino de la secuencia señal, un sitio para la enzima de restricción *Xba*I y una secuencia Kozak optimizada (5'-CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC C ATG GGG TCA ACC GCC

10
15

cebador de la cadena pesada 5'αL-1R1 15C4 (SEQ ID NO: 53):
5'- CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC C ATG GGG TCA ACC GCC
XbaI Kozak M G S T A
ATC CTCG -3'
I L (SEQ ID NO: 55)

20 cebador de la cadena pesada 3'αL-1R1 15C4 (SEQ ID NO: 54):
5'- GTG GAG GCA CTA GAG ACC GTG ACC AGG GTT CC-3'
T S A S S V T V L T G (SEQ ID NO: 56)
BsmBI

Construcción del clon de expresión de la cadena pesada de IgG1 anti-IL1-R1

25 El clon de la cadena pesada de longitud completa de αL-1R1 15C4 se obtuvo de un clon pCR4:15C4 cadena pesada mediante amplificación con PCR con los cebadores de la cadena pesada de 15C4 de αL-1 R1 5' y 3'. La reacción de PCR generó un producto de 442 pares de bases que codifican los 137 residuos de aminoácidos (incluida la secuencia señal de la cadena pesada de 19 aminoácidos) de la región variable de la cadena pesada de αL-1R1 15C4. El producto de la PCR se purificó usando un kit de purificación QIAquick PCR y después se digirió con *Xba*I and *Bsm*BI, se aisló en gel y se purificó usando un kit de extracción en gel QIAquick. Este fragmento que contiene la región variable de la cadena pesada de αL-1R1 15C4 completa se ligó después en el vector de expresión en mamíferos pDSRα19:hgG1C_H. El clon de expresión de IgG1 cadena pesada de 15C4 se secuenció en ADN para confirmarlo que codificaba el mismo péptido de la región variable de la cadena pesada que se identificó en el hibridoma 15C4. El vector de expresión final, pDSRα19:15C4 IgG1, cadena pesada, tenía 6173 pares de bases y contenía las siete regiones funcionales que se describen en la Tabla 8.

30
35

Tabla 8

Número de pares
de bases del plásmido

2 a 881	Una señal de terminación de la transcripción/poliadenilación de la subunidad α de la hormona glicoproteica de la hipófisis bovina (α -FSH) (Goodwin et al., 1983, <i>Nucleic Acids Res.</i> 11 :6873-82; Número de acceso Genbank X00004)
882 a 2027	Un minigen de dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón que contiene el promotor de DHFR endógeno de ratón, las secuencias codificadoras de ADNc y las señales de terminación de la transcripción/poliadenilación DHFR (Gasser et al., 1982, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 79 :6522-6; Nunberg et al., 1980, <i>Cell</i> 19 : 355-64; Setzer et al., 1982, <i>J. Biol. Chem.</i> 257 :5143-7; McGrogan et al., 1985, <i>J. Biol. Chem.</i> 260 : 2307-14)
2031 a 3947	Secuencias de pBR322 que contienen el gen marcador de resistencia a ampicilina y el origen de replicación del plásmido en <i>E. coli</i> (Número de acceso Genbank J01749)
3949 a 4292	Un promotor temprano de SV40, potenciador y origen de replicación (Takebe et al., 1988, <i>Mol. Cell Biol.</i> 8 : 466:-72; Número de acceso Genbank J02400)
4299 a 4565	Un elemento potenciador de la traducción del dominio LTR de HTLV-1 (Seiki et al., 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 80 :3618-22, Número de acceso Genbank J02029)
4574 a 4730	Un intrón de SV40 16S, 19S, señales de corte y empalme de donante/aceptor (Okayama y Berg, 1983, <i>Mol. Cell Biol.</i> 3 :280-9; Número de acceso Genbank J02400)
4755 a 6173	El ADNc de IgG1, cadena pesada de 15C4, entre los sitios <i>Xba</i> I y <i>Sa</i> II

5

Construcción de pDSR19:hlgG2C_H

Se construyó un plásmido de expresión de MAb pDSR α 19:región variable humana/región constante humana IgG2 (hVh/hCh2) como resultado de un ligamiento de tres trozos del producto de PCR de la región variable del anticuerpo humano terminado con *Xba*I y *Bsm*BI, un producto de PCR de la región constante de IgG2 humana (dominios C_{H1}, bisagra, C_{H2} y C_{H3}) con extremos *Bsm*BI y *Sa*II y un pDSR α 19 linearizado con extremos *Xba*I y *Sa*II. El vector de expresión final, pDSR α 19:región variable humana/región constante humana IgG1 (hVh/hCh2) (véase la solicitud de patente provisional de EE.UU. de propiedad conjunta y pendiente de tramitación n° 60/370.407, presentada el 5 de abril de 2002, "Human Anti-OPGL Neutralizing Antibodies As Selective OPGL Pathway Inhibitors"), tiene 6164 pares de bases y contiene las 7 regiones funcionales descritas en la Tabla 9.

15

Tabla 9

Número de pares
de bases del plásmido

2 a 881	Una señal de terminación de la transcripción/poliadenilación de la subunidad α de la hormona glicoproteica de la hipófisis bovina (α -FSH) (Goodwin et al., 1983, <i>Nucleic Acids Res.</i> 11 :6873-82; Número de acceso Genbank X00004)
882 a 2027	Un minigen de dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón que contiene el promotor de DHFR endógeno de ratón, las secuencias codificadoras de ADNc y las señales de terminación de la transcripción/poliadenilación DHFR (Gasser et al., 1982, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 79 :6522-6; Nunberg et al., 1980, <i>Cell</i> 19 : 355-64; Setzer et al., 1982, <i>J. Biol. Chem.</i> 257 :5143-7; McGrogan et al., 1985, <i>J. Biol. Chem.</i> 260 : 2307-14)
2031 a 3947	Secuencias de pBR322 que contienen el gen marcador de resistencia a ampicilina y el origen de replicación del plásmido en <i>E. coli</i> (Número de acceso Genbank J01749)
3949 a 4292	Un promotor temprano de SV40, potenciador y origen de replicación (Takebe et al., 1988, <i>Mol. Cell Biol.</i> 8 : 466:-72; Número de acceso Genbank J02400)
4299 a 4565	Un elemento potenciador de la traducción del dominio LTR de HTLV-1 (Seiki et al., 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 80 :3618-22, Número de acceso Genbank J02029)
4574 a 4730	Un intrón de SV40 16S, 19S, señales de corte y empalme de donante/aceptor (Okayama y Berg, 1983, <i>Mol. Cell Biol.</i> 3 :280-9; Número de acceso Genbank J02400)
4755 a 6164	El ADNc de la cadena pesada de hVh/hCh2, entre los sitios <i>Xba</i> I y <i>Sa</i> II La secuencia de este fragmento de la cadena pesada figura más adelante (SEQ ID NO: 57) con los sitios de restricción subrayados. <i>Xba</i> I

	<p>TCTAGA CCACCATGGA CATGAGGGTC CCCGCTCAGC TCCTGGGGCT CCTGCTATTG TGGTTGAGAG GTGCCAGATG TGAGGTCCAG CTGGTGCAGTCTGGGGGAGG CTTGGTACAT CCTGGGGGGT CCCTGAGACT CTCCTGTGCAGGCTCTGGAT TCACCTCAG TGGCCATGCT TTGCACTGGG TTCGCCAGGCTCCAGGAAAA GGTCTGGAGT GGGTATCAGG TATTGGTACT CATGGTGGGACATACTATGC AGACTCCGTG AAGGGCCGAT TCACCATCTC CAGAGACAATGCCAAGAAGT CCTTGTTTCT TCAAATGAAC AGCCTGAGCG CCGAGGACATGGCTGTGTAT TACTGTACAA GAAGAAACTG</p> <p style="text-align: right;"><i>BsmBI</i></p> <p>GGGACAATTT GACTACTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCTAGTG CCTCCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCOC TGGCGCCCTG CTCAGGAGC ACCTCCGAGA GCACAGCGGCCCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG ACGGTGTCGTGGAATCAGG CGCTCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC AGCTGTCTACAGTCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGAOCG TGCCCTCAGCAACTTCGGC ACCCAGACCT ACACCTGCAA CGTAGATCAC AAGCCCAGCAACCAAGGT GGACAAGACA GTTGAGCGCA AATGTTGTGT CGAGTGCCACCGTGCCAG CACCACCTGT GGCAGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCAAGTGCCTGGTGGTGGA CGTGAGCCAC GAAGACCCCG AGGTCCAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAAGCCAC GGGAGGAGCAGTTCAACAGC ACGTCCGTG TGGTACGCT CCTCACCGTT GTGCACCAGGACTGGCTGAA CGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGGCTCCAGCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA ACCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCCG GGAGGAGATG ACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTACCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACCTACA AGACCACACCTCCATGCTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AAGTCAACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACCGAG</p> <p style="text-align: right;"><i>Sall</i></p> <p>AAGAGCCTCT COCTGTCTCCGGGTAATGA TAAGTCGAC</p>
--	--

5 El plásmido lineal pDSR α 19:hlgG2_{C_H} se preparó digiriendo el plásmido pDSR19:región variable humana/región constante humana IgG2 con las enzimas de restricción XbaI y BsmBI para separar la región variable humana y se purificó utilizando el kit de extracción de gel QIAquick. El plásmido lineal pDSR α 19:hlgG2_{C_H} que contiene el dominio de la región constante de IgG2 humana de 1 kpb se utilizó para aceptar las regiones variables del anticuerpo α IL-1R1 derivadas de hibridoma.

Construcción del clon de expresión de la cadena pesada de IgG2 anti-IL1-R1

10 El fragmento de la región variable de la cadena pesada de α IL-1R1 15C4, descrito anteriormente, se ligó en el vector de expresión en mamíferos pDSR α 19:hlgG2_{C_H}. El clon de expresión de IgG2 cadena pesada de 15C4 se secuenció su ADN para confirmár que codificadba el mismo péptido de la región variable de la cadena pesada que se identificó en el hibridoma 15C4. El vector de expresión final, pDSR α 19:15C4 IgG2, cadena pesada, tenía 6161 pares de bases y
 15 contiene las siete regiones funcionales que se describen en la Tabla 10.

Tabla 10

Número de pares
de bases del plásmido

2 a 881	Una señal de terminación de la transcripción/poliadenilación de la subunidad α de la hormona glicoproteica de la hipófisis bovina (α -FSH) (Goodwin et al., 1983, <i>Nucleic Acids Res.</i> 11 :6873-82; Número de acceso Genbank X00004)
882 a 2027	Un minigen de dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón que contiene el promotor de DHFR endógeno de ratón, las secuencias codificadoras de ADNc y las señales de terminación de la transcripción/poliadenilación DHFR (Gasser et al., 1982, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 79 :6522-6; Nunberg et al., 1980, <i>Cell</i> 19 : 355-64; Setzer et al., 1982, <i>J. Biol. Chem.</i> 257 :5143-7; McGrogan et al., 1985, <i>J. Biol. Chem.</i> 260 : 2307-14)
2031 a 3947	Secuencias de pBR322 que contienen el gen marcador de resistencia a ampicilina y el origen de replicación del plásmido en <i>E. coli</i> (Número de acceso Genbank J01749)
3949 a 4292	Un promotor temprano de SV40, potenciador y origen de replicación (Takebe et al., 1988, <i>Mol. Cell Biol.</i> 8 : 466:-72; Número de acceso Genbank J02400)
4299 a 4565	Un elemento potenciador de la traducción del dominio LTR de HTLV-1 (Seiki et al., 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 80 :3618-22, Número de acceso Genbank J02029)
4574 a 4730	Un intrón de SV40 16S, 19S, señales de corte y empalme de donante/aceptor (Okayama y Berg, 1983, <i>Mol. Cell Biol.</i> 3 :280-9; Número de acceso Genbank J02400)
4755 a 6161	El ADNc de IgG2, cadena pesada de 15C4, entre los sitios <i>Xba</i> I y <i>Sa</i> II

5

Construcción de pDSR19:hlgG4C_H

Se construyó un plásmido de expresión de MAb pDSR α 19:región variable humana/región constante humana IgG4 (hVh/hCh4) como resultado de un ligamiento de tres trozos del producto de PCR de la región variable del anticuerpo humano terminado con *Xba*I y *Bsm*BI, una región constante de IgG4 humana digerida con *Bsm*BI y *Sa*II aislada en gel (dominios C_{H1}, bisagra, C_{H2} y C_{H3}) y un pDSR α 19 linearizado con extremos *Xba*I y *Sa*II. El vector de expresión final, pDSR α 19:región variable humana/región constante humana IgG4 (hVh/hCh4) (véase la solicitud de patente provisional de EE.UU. de propiedad conjunta y pendiente de tramitación n° 60/370.407, presentada el 5 de abril de 2002, "Human Anti-OPGL Neutralizing Antibodies As Selective OPGL Pathway Inhibitors"), tiene 6167 pares de bases y contiene las 7 regiones funcionales descritas en la Tabla 11.

10

15

Tabla 11

Número de pares
de bases del plásmido

20

2 a 881	Una señal de terminación de la transcripción/poliadenilación de la subunidad α de la hormona glicoproteica de la hipófisis bovina (α -FSH) (Goodwin et al., 1983, <i>Nucleic Acids Res.</i> 11 :6873-82; Número de acceso Genbank X00004)
882 a 2027	Un minigen de dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón que contiene el promotor de DHFR endógeno de ratón, las secuencias codificadoras de ADNc y las señales de terminación de la transcripción/poliadenilación DHFR (Gasser et al., 1982, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 79 :6522-6; Nunberg et al., 1980, <i>Cell</i> 19 : 355-64; Setzer et al., 1982, <i>J. Biol. Chem.</i> 257 :5143-7; McGrogan et al., 1985, <i>J. Biol. Chem.</i> 260 : 2307-14)
2031 a 3947	Secuencias de pBR322 que contienen el gen marcador de resistencia a ampicilina y el origen de replicación del plásmido en <i>E. coli</i> (Número de acceso Genbank J01749)
3949 a 4292	Un promotor temprano de SV40, potenciador y origen de replicación (Takebe et al., 1988, <i>Mol. Cell Biol.</i> 8 : 466:-72; Número de acceso Genbank J02400)
4299 a 4565	Un elemento potenciador de la traducción del dominio LTR de HTLV-1 (Seiki et al., 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 80 :3618-22, Número de acceso Genbank J02029)
4574 a 4730	Un intrón de SV40 16S, 19S, señales de corte y empalme de donante/aceptor (Okayama y Berg, 1983, <i>Mol. Cell Biol.</i> 3 :280-9; Número de acceso Genbank J02400)
4755 a 6167	El ADNc de la cadena pesada de hVh/hCh4, entre los sitios <i>Xba</i> I y <i>Sa</i> II La secuencia de este fragmento de la cadea pesada figura más adelante (SEQ ID NO: 58) con los sitios de restricción subrayados:

	<p><i>XbaI</i> TCTAGACCACCAT GGACATGAGG GTCCCCGCTC AGCTCCTGGG GCTCCTGCTA TTGTGGTTGA GAGGTGCCAG ATGTGAGGTC CAGCTGGTGCAGTCTGGGGG AGGCTTGGTA CATCCTGGGG GGTCCCTGAG ACTCTCCTGTGCAGGCTCTG GATTCACCTT CAGTGGOCAT GCTTTGCACT GGGTTCGCCAGGCTCCAGGA AAAGGTCTGG AGTGGGTATC AGGTATTGGT ACTCATGGTGGGACATACTA TGCAGACTCC GTGAAGGGCC GATTCACCAT CTCAGAGACAATGCCAAGA ACTCCTTGT TCTTCAAATG AACAGCCTGA GCGCCGAGGACATGGCTGTG TATTACTGTA CAAGAAGAAA CTGGGGACAA TTTGACTACTGGGGCCAGGG</p> <p style="text-align: center;"><i>BsmBI</i></p> <p>AACCTGGTC ACCGTCCTA GTGCCAGCAC CAAGGGGCCATCCGTCCTCC CCCTGGCGCC CTGCTCCAGG AGCACCTCCG AGAGCACAGCCGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG GTGACGGTGTCTGGAACTC AGGCGCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA CCGTGCCCTCCAGCAGCTTG GGCACGAAGA CCTACACCTG CAACGTAGAT CACAAGCCAGCAACACCAA GGTGGACAAG AGAGTTGAGT CCAAATATGG TCOCOCATGCCATCATGCC CAGCACCTGA GTTCTGGGG GGACCATCAG TCTTCTGTTCCCCCAAAA CCCAAGGACA CTCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTACGTCGCTGGT GGTGGACGTG AGCCAGGAAG ACCCCGAGGT CCAGTTCAACTGGTACGTGG ATGGCGTGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCAGTTC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCTC ACCGTCCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAAGGCCTCCCGT CCTCCATCGA GAAAACCATC TCCAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAGCCA CAGGTGTACA CCTGCCCC ATCCAGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCTTGGTCA AAGGCTTCTA CCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGACCAAGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TACAGCAGGCTAACCGTGA CAAGAGCAGG TGGCAGGAGG GGAATGTCTT CTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC</p> <p style="text-align: center;"><i>SalI</i></p> <p>ACACAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCTGGGT AAATGATAAG TCGAC</p>
--	---

5 El plásmido lineal pDSR α 19:hlgG4_{C_H} se preparó digiriendo el plásmido pDSR19:región variable humana/región constante humana IgG4 con las enzimas de restricción *XbaI* y *BsmBI* para separar la región variable humana y se purificó utilizando el kit de extracción de gel QIAquick. El plásmido lineal pDSR α 19:hlgG4_{C_H} que contiene el dominio de la región constante de IgG4 humana de 1 kpb se utilizó para aceptar el hibridoma derivado de las regiones variables del anticuerpo α IL-1R1.

Construcción del clon de expresión de la cadena pesada de IgG4 anti-IL1-R1

10 El fragmento de la región variable de la cadena pesada de α IL-1R1 15C4, descrito anteriormente, se ligó en el vector de expresión en mamíferos pDSR α 19:hlgG4_{C_H}. El clon de expresión de IgG4 cadena pesada de 15C4 se secuenció su ADN para confirmár que codificadba el mismo péptido de la región variable de la cadena pesada que se identificó en el hibridoma 15C4. El vector de expresión final, pDSR α 19:15C4 IgG4, cadena pesada, tenía 6164 pares de bases y contiene las siete regiones funcionales que se describen en la Tabla 12.

15

Tabla 12

Número de pares
de bases del plásmido

2 a 881	Una señal de terminación de la transcripción/poliadenilación de la subunidad α de la hormona glicoproteica de la hipófisis bovina (α -FSH) (Goodwin et al., 1983, <i>Nucleic Acids Res.</i> 11 :6873-82; Número de acceso Genbank X00004)
882 a 2027	Un minigen de dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón que contiene el promotor de DHFR endógeno de ratón, las secuencias codificadoras de ADNc y las señales de terminación de la transcripción/poliadenilación DHFR (Gasser et al., 1982, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 79 :6522-6; Nunberg et al., 1980, <i>Cell</i> 19 : 355-64; Setzer et al., 1982, <i>J. Biol. Chem.</i> 257 :5143-7; McGrogan et al., 1985, <i>J. Biol. Chem.</i> 260 : 2307-14)
2031 a 3947	Secuencias de pBR322 que contienen el gen marcador de resistencia a ampicilina y el origen de replicación del plásmido en <i>E. coli</i> (Número de acceso Genbank J01749)
3949 a 4292	Un promotor temprano de SV40, potenciador y origen de replicación (Takebe et al., 1988, <i>Mol. Cell Biol.</i> 8 : 466-72; Número de acceso Genbank J02400)
4299 a 4565	Un elemento potenciador de la traducción del dominio LTR de HTLV-1 (Seiki et al., 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 80 :3618-22, Número de acceso Genbank J02029)
4574 a 4730	Un intrón de SV40 16S, 19S, señales de corte y empalme de donante/aceptor (Okayama y Berg, 1983, <i>Mol. Cell Biol.</i> 3 :280-9; Número de acceso Genbank J02400)
4755 a 6164	El ADNc de IgG4, cadena pesada de 15C4, entre los sitios <i>Xba</i> I y <i>Sa</i> II

5

Ejemplo 7

Expresión de anticuerpos anti-IL-1R1 en células de ovario de hámster chino (CHO)

10 Los anticuerpos anti-IL-1R1 recombinantes se generan en células de ovario de hámster chino, específicamente CHO AM-1/D, tal como se describe en la patente de EE.UU. n° 6.210.924. En síntesis, las secuencias de ADN que codifican las cadenas pesada o ligera completas de cada uno de los anticuerpos anti-IL-1R1 de la invención se clonan en vectores de expresión. Las células CHO AM-1/D se co-transfectan con un vector de expresión capaz de expresar una cadena pesada completa y un vector de expresión que expresa la cadena ligera completa del anticuerpo anti-IL-1R1

15 apropiado. Por ejemplo, para generar el anticuerpo 26F5, las células se co-transfectan con un vector capaz de expresar una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en la SEQ ID NO: 38 y un vector capaz de expresar una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 24. Para generar el anticuerpo 27F2, las células se co-transfectan con un vector capaz de expresar una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 38, y un vector capaz de expresar una cadena pesada completa que comprende la

20 secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 30. Para generar el anticuerpo 15C4, las células se co-transfectan con un vector capaz de expresar una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 40, y un vector capaz de expresar una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 32, SEQ ID

25 NO: 34 o SEQ ID NO: 36. La Tabla 13 resume las cadenas ligera y pesada completas para los diversos anticuerpos de IL-1R1. La designación "...IgG_" describe la secuencia de la región constante del anticuerpo particular.

Tabla 13

Anticuerpo	Región Variable de la Cadena Pesada + Región Constante de la Cadena Pesada	Cadena Pesada Completa
26F5/IgG1 (nucleótido)	SEQ ID NO: 9 + SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 19
26F5/IgG1 (aminoácido)	SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 20
26F5/IgG2 (nucleótido)	SEQ ID NO: 9 + SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 21
26F5/IgG2 (aminoácido)	SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 22
26F5/IgG4 (nucleótido)	SEQ ID NO: 9 + SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 23
26F5/IgG4 (aminoácido)	SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 24
27F2/IgG1 (nucleótido)	SEQ ID NO: 13 + SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 25
27F2/IgG1 (aminoácido)	SEQ ID NO: 14 + SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 26
27F2/IgG2 (nucleótido)	SEQ ID NO: 13 + SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 27
27F2/IgG2 (aminoácido)	SEQ ID NO: 14 + SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 28
27F2/IgG4 (nucleótido)	SEQ ID NO: 13 + SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 29
27F2/IgG4 (aminoácido)	SEQ ID NO: 14 + SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 30
15C4/IgG1 (nucleótido)	SEQ ID NO: 15 + SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 31
15C4/IgG1 (aminoácido)	SEQ ID NO: 16 + SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 32
15C4/IgG2 (nucleótido)	SEQ ID NO: 15 + SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 33
15C4/IgG2 (aminoácido)	SEQ ID NO: 16 + SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 34
15C4/IgG4 (nucleótido)	SEQ ID NO: 15 + SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 35
15C4/IgG4 (aminoácido)	SEQ ID NO: 16 + SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 36
Anticuerpo	Región Variable de la Cadena Ligera + Región Constante de la Cadena Ligera	Cadena Ligera Completa
26F5/27F2 (nucleótido)	SEQ ID NO: 11 + SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 37
26F5/27F2 (aminoácido)	SEQ ID NO: 12 + SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 38
15C4 (nucleótido)	SEQ ID NO: 17 + SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 39
15C4 (aminoácido)	SEQ ID NO: 18 + SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 40

5 La expresión estable de anticuerpos anti-IL-1R1 se consigue contransfectando células CHO AM-1/D deficientes en dihidrofolato reductasa (DHFR) con los vectores de expresión. Las transfecciones se llevan a cabo utilizando técnicas estándares (coprecipitación en fosfato cálcico) y selección de DHFR. Las colonias transfectadas se aíslan y cultivan hasta confluencia en placas de 24 pocillos. Los anticuerpos producidos por las células transfectadas se examinan para determinar su plegamiento apropiado y la actividad neutralizante. Se seleccionan los clones hiperproductores de anticuerpos anti-IL-1R1 adecuadamente plegados de los isotipos IgG1, IgG2 e IgG4 y los anticuerpos se purifican como se describe más adelante.

10

Ejemplo 8**Producción de anticuerpo anti-IL-1R1**

5 Los anticuerpos anti-IL-1R1 se producen mediante expresión en una línea clonal de células CHO. Para cada uno de los ciclos de producción, las células de un solo vial se descongelan en medios de cultivo celular exento de suero. Las células se cultivan inicialmente en un matraz T y se expanden en serie a través de una serie de matraces giratorios hasta que se ha generado suficiente inóculo para sembrar un biorreactor de 20 L. Tras el crecimiento durante 5-10 días, el cultivo se usa después para inocular un biorreactor de 300 L. Tras el crecimiento durante 5-10 días adicionales, el cultivo se utiliza para inocular un biorreactor de 2000 L. La producción se lleva a cabo en un biorreactor de 2000 L utilizando un cultivo discontinuo en el que se añade una alimentación nutriente que contiene componentes de medio concentrado para mantener el crecimiento celular y la viabilidad del cultivo. La producción dura aproximadamente dos semanas, tiempo durante el cual las células producen anticuerpo anti-IL-1R1 de forma constitutiva y lo secretan al medio de cultivo celular.

El reactor de producción está controlado a un pH y temperatura fijados y a un nivel de oxígeno disuelto: el pH se controla con gas dióxido de carbono y con la adición de carbonato sódico; el oxígeno disuelto se controla con flujos de aire, de gas nitrógeno y oxígeno.

Al final de la producción, el caldo celular se introduce en una centrifuga de apilamiento de discos y el sobrenadante del cultivo se separa de las células. El concentrado se aclara después a través de un filtro en profundidad, seguido de un filtro de 0,2 µm. El medio acondicionado aclarado se concentra después mediante ultrafiltración de flujo tangencial. El medio acondicionado se concentra de 15 a 30 veces. El medio acondicionado concentrado resultante se procesa mediante purificación o se congela para purificación posterior.

Ejemplo 9**Representación en mapa del epítipo utilizando proteínas de fusión con avidina**

30 Para generar proteínas de fusión con avidina, el ADNc que codifica avidina de pollo (con secuencia señal endógena) se unió con el extremo 5' de ADNcs que codifican los dominios extracelulares maduros de IL-1R1 humanos o de cinomolgo fusionados a una secuencia marcadora FLAG en el extremo 3'. Los genes de fusión marcados con FLAG se ensamblaron en un vector pALTERMAX usando técnicas moleculares convencionales. La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión avidina-IL-1R1 humana se muestra en la Figura 23 (SEQ ID NO: 59). La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión avidina-IL-1R1 de cinomolgo se muestra en la Figura 24 (SEQ ID NO: 60). Un panel de proteínas avidina-cinIL-1R1-FLAG, en las que los aminoácidos humanos se habían sustituido por los residuos correspondientes de cinomolgo se generó usando el sistema de mutagénesis Altered Sites II Mammalian In Vitro Mutagenesis System (Promega Corp.). Las mutaciones se ilustran en la Figura 24.

40 Los plásmidos que codifican las proteínas mutantes y de tipo salvaje avidina-cinIL-1R así como la proteína avidina-huIL-1R1-FLAG se transfectaron de forma transitoria en células 293T usando el reactivo de transfección Cytofectine (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Los transfectantes simulados se usaron como controles negativos. La unión del anticuerpo monoclonal (MAb) anti-huIL-1R1 a estas proteínas se evaluó mediante transferencia Western y ensayos de unión con perlas usando medio acondicionado (CM) recogido de las células transfectadas.

45 Para el análisis de transferencia Western, el CM se diluyó 1:3 en tampón de muestra de SDS no reductor, se llevó a ebullición durante 5-10 minutos y se cargó en geles de Tris-glicina al 10 %. Después de SDS-PAGE y transferencia Western, las membranas se bloquearon con BSA al 3 %/ovoalbúmina al 1 % en PBS/Tween-20 al 0,1% (PBST) y se tiñeron con los MAb anti-huIL-1R1. Para la detección secundaria se utilizó un anticuerpo IgG-Fc-HRP anti-humano de cabra (Pierce Chemical Co.) diluido a 1:15.000 en PBST. La detección de anti-FLAG se utilizó para normalizar la carga de proteínas. La captura de imágenes y la densitometría se realizaron utilizando un sistema de imágenes digital FluorChem 8000 (Alpha Innotech Corp.). Las intensidades de la señal para los MAb anti-huIL-1R1 se normalizaron frente a los valores para el anticuerpo anti-FLAG para contar la variación de la carga de proteínas. La unión del anticuerpo se expresó como un porcentaje de la unión avidina-IL-1R1 humano-FLAG.

55 Los resultados de la transferencia Western se muestran en la Figura 25A. La Figura 25B muestra el análisis densitométrico de un conjunto duplicado de experimentos de transferencia Western. Los residuos humanos críticos para la unión del anticuerpo son aquellos que restablecen la señal cuando se sustituyen en cinIL-1R1. En general, las mutaciones 1 y 2 (ilustradas en la Figura 24), solas o en combinación, restablecieron la unión a muchos de los anticuerpos (15C4/IgG2, 5B8, 1C2, 24H2, 16E9, 26E4 y 20G1), mientras que las mutaciones 10.1 y 10.2 no lo hicieron. Ninguno de estos anticuerpos se unía a cinIL-1R1 de tipo salvaje. Dos anticuerpos (27F2 and 19C8) se unieron de forma consistente a todas las proteínas mutantes, así como a cinIL-1R1 de tipo salvaje. Esto sugirió que el epítipo 4 (residuos Y279-V281 de cinIL-1R1), identificado en las proteínas parálogas de rata/humanas y que no variaba en IL-1R1 de cinomolgo era el epítipo dominante para estos anticuerpos. El epítipo 4 está en negritas y subrayado en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 24.

En los ensayos de unión multiplexados basados en perlas, las proteínas de fusión de avidina se capturaron mediante incubación del CM con perlas fluorescentes revestidas con biotina, un conjunto de perlas por proteína de perfusión (Beadlyte Multi-Biotin 10plex Bead Kit; Upstate Biotechnologies). Las perlas se lavaron y agruparon en PBST y se añadieron partes alícuotas a los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo con filtro (Millipore Corp.). Los anticuerpos (MAbs anti-huLL-1R1 o Mab anti-FLAG) se añadieron a razón de 25 µg/ml y se incubaron durante 1 hora. Las perlas se lavaron de nuevo y una mezcla de anticuerpo IgG anti-ratón conjugada con ficoeritrina y (Fab')₂ de IgG anti-humana se utilizó para detectar la unión del anticuerpo. Después de 1 hora de incubación, las perlas se lavaron y resuspendieron en PBST. Las intensidades medias de fluorescencia (MFI) se midieron usando un Luminex 100 (Luminex Corp). Los datos se normalizaron usando los valores de MFI para la unión de Mabs anti-FLAG para representar la variación en la carga proteica. La unión del anticuerpo se expresó como un porcentaje de la unión a avidina-huLL-1R1-FLAG (Figura 26). El patrón de unión de los anticuerpos anti-IL-1R1 a las proteínas avidina-cinoll-1R1-FLAG mutadas con residuos humanos, así como las proteínas de IL-1R1 de tipo salvaje humanas y de cinomolgo era consistente con el análisis de inmunotransferencia mostrado en la Figura 25.

15 Se describen

1. Un anticuerpo humano aislado que se une específicamente al receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1), que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos según se recoge en cualquiera de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.

2. Un anticuerpo humano aislado que se une específicamente al receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1), que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos según se recoge en cualquiera de SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 18, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.

3. Un anticuerpo humano aislado que se une específicamente al receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1), que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos según se recoge en cualquiera de SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 36 o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.

4. Un anticuerpo humano aislado que se une específicamente al receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1), que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos según se recoge en cualquiera de SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 40 o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.

5. Un anticuerpo humano aislado que se une específicamente al receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1), en donde el anticuerpo comprende: a. una cadena pesada que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos según se recoge en SEQ ID NO: 10, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y una cadena ligera que tiene una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 12, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; b. una cadena pesada que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 14, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y una cadena ligera que tiene una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 12, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; o c. una cadena pesada que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 16, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y una cadena ligera que tiene una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 18, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.

6. El anticuerpo de la cláusula 5, en donde la cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 10, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y la cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 12, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.

7. El anticuerpo de la cláusula 6, en donde la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 10, y en donde la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 12, y en

donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1).

- 5 8. El anticuerpo de la cláusula 5, en donde la cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 14, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y la cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 12, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.
- 10 9. El anticuerpo de la cláusula 8, en donde la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 14, y en donde la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 12, en donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1).
- 15 10. El anticuerpo de la cláusula 5, en donde la cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 16, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y la cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 18, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.
- 20 11. El anticuerpo de la cláusula 10, en donde la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 16, y en donde la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 18, en donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1).
- 25 12. Un anticuerpo humano aislado que se une específicamente al receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1), en donde el anticuerpo comprende:
- 30 a. una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 38, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; y
- 35 b. una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 30, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.
- 40 13. El anticuerpo de la cláusula 12, en donde la cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 20, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y la cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 38, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.
- 45 14. El anticuerpo de la cláusula 13, en donde la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 20, y en donde la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 38, en donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1).
- 50 15. El anticuerpo de la cláusula 12, en donde la cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 22, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y la cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 38, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.
- 55 16. El anticuerpo de la cláusula 15, en donde la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 22, y en donde la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 38, en donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1).
- 60 17. El anticuerpo de la cláusula 12, en donde la cadena pesada comprende una región variable de la cadena
- 65

pesada que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 24, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y la cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 38, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.

18. El anticuerpo de la cláusula 17, en donde la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 24, y en donde la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 38, en donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1).

19. El anticuerpo de la cláusula 12, en donde la cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 26, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y la cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 38, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.

20. El anticuerpo de la cláusula 19, en donde la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 26, y en donde la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 38, en donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1).

21. El anticuerpo de la cláusula 12, en donde la cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 28, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y la cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 38, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.

22. El anticuerpo de la cláusula 21, en donde la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 28, y en donde la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 38, en donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1).

23. El anticuerpo de la cláusula 12, en donde la cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 30, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y la cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 38, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.

24. El anticuerpo de la cláusula 23, en donde la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 30, y en donde la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 38, en donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1).

25. Un anticuerpo humano aislado que se une específicamente al receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1), en donde el anticuerpo comprende:

a. una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 40, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; y

b. una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 36, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.

26. El anticuerpo de la cláusula 25, en donde la cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 32, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y la cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en

SEQ ID NO: 40, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.

- 5 27. El anticuerpo de la cláusula 26, en donde la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 32, y en donde la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 40, en donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1).
- 10 28. El anticuerpo de la cláusula 25, en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 34, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 40, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.
- 15 29. El anticuerpo de la cláusula 28, en donde la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 34, y en donde la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 40, en donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1).
- 20 30. El anticuerpo de la cláusula 25, en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 36, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 40, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.
- 25 31. El anticuerpo de la cláusula 30, en donde la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 36, y en donde la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 40, en donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1).
- 30 32. El anticuerpo de la cláusula 1, 2, 3, 4, 5, 12 ó 25, en donde la cadena pesada y la cadena ligera están conectadas mediante un enlazador flexible para formar un anticuerpo de cadena sencilla.
- 35 33. El anticuerpo de la cláusula 32, que es un anticuerpo Fv de cadena sencilla.
- 40 34. El anticuerpo de la cláusula 1, 2, 3, 4, 5, 12 ó 25, que es un fragmento de anticuerpo Fab.
35. El anticuerpo de la cláusula 1, 2, 3, 4, 5, 12 ó 25, que es un fragmento de anticuerpo Fab'.
- 45 36. El anticuerpo de la cláusula 1, 2, 3, 4, 5, 12 ó 25, que es un fragmento de anticuerpo (Fab')₂.
37. El anticuerpo de la cláusula 1, 2, 3, 4, 5, 12 ó 25, en donde el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano.
38. El anticuerpo de la cláusula 1, 2, 3, 4, 5, 12 ó 25, en donde el anticuerpo inhibe la unión de IL-1 a su receptor.
- 50 39. Un método para tratar una enfermedad mediada por IL-1 en un paciente, que comprende administrar a un paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz del anticuerpo de la realización 38.
40. Una composición farmacéutica, que comprende un soporte farmacéuticamente aceptable y una cantidad farmacéuticamente eficaz del anticuerpo de la realización 38.
- 55 41. Un método para tratar una enfermedad mediada por IL-1 en un paciente, que comprende administrar a un paciente la composición farmacéutica de la realización 40.
42. Una cadena pesada que comprende una región variable y una región constante, en donde la región variable comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en cualquiera de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.
- 60 43. Una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en cualquiera de SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 36, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.
- 65

- 5 44. Una cadena ligera que comprende una región variable y una región constante, en donde la región variable comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en cualquiera de SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 18, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.
45. Una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se recoge en cualquiera de SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 40, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.
- 10 46. Un anticuerpo humano aislado, que comprende:
- 15 a. regiones de armazón de la cadena pesada humana, una región CDR1 de la cadena pesada humana, una región CDR2 de la cadena pesada humana y una región CDR3 de la cadena pesada humana, en donde la región CDR3 de la cadena pesada humana tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 o SEQ ID NO: 69; y
- 20 b. regiones de armazón de la cadena ligera humana, una región CDR1 de la cadena ligera humana, una región CDR2 de la cadena ligera humana y una región CDR3 de la cadena ligera humana, en donde la región CDR3 de la cadena ligera humana tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74 o SEQ ID NO: 75; en donde el anticuerpo se une específicamente a receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1).
47. El anticuerpo humano aislado de la cláusula 46, en donde la región CDR2 de la cadena pesada humana tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 o SEQ ID NO: 66, y la región CDR2 de la cadena ligera humana tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72 o SEQ ID NO: 73.
- 25 48. El anticuerpo humano aislado de la cláusula 46, en donde la región CDR1 de la cadena pesada humana tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62 o SEQ ID NO: 63, y la región CDR1 de la cadena ligera humana tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 o SEQ ID NO: 71.
- 30 49. Un anticuerpo humano aislado que comprende una región CDR1 de la cadena pesada humana, en donde la CDR1 de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62 o SEQ ID NO: 63, y en donde el anticuerpo se une específicamente a receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1).
- 35 50. Un anticuerpo humano aislado que comprende una región CDR2 de la cadena pesada humana, en donde la CDR2 de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 o SEQ ID NO: 66, y en donde el anticuerpo se une específicamente a receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1).
- 40 51. Un anticuerpo humano aislado que comprende una región CDR3 de la cadena pesada humana, en donde la CDR3 de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 o SEQ ID NO: 69, y en donde el anticuerpo se une específicamente a receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1).
52. Un anticuerpo humano aislado que comprende una región CDR1 de la cadena ligera humana, en donde la CDR1 de la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 o SEQ ID NO: 71, y en donde el anticuerpo se une específicamente a receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1).
- 45 53. Un anticuerpo humano aislado que comprende una región CDR2 de la cadena pesada humana, en donde la CDR2 de la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72 o SEQ ID NO: 73, y en donde el anticuerpo se une específicamente a receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1).
- 50 54. Un anticuerpo humano aislado que comprende una región CDR3 de la cadena pesada humana, en donde la CDR3 de la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74 o SEQ ID NO: 75, y en donde el anticuerpo se une específicamente a receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1).
- 55 55. Un anticuerpo humano aislado que se une específicamente al polipéptido de SEQ ID NO: 76.
57. El anticuerpo de la cláusula 55, en donde el anticuerpo se une específicamente al epítipo 4 de IL1-R1.
- 58 El anticuerpo de la cláusula 5, 12 ó 25, que es un anticuerpo IgG2.
- 60 59. El anticuerpo de la cláusula 5, 12 ó 25, que se une específicamente al polipéptido de SEQ ID NO: 76.
- 60 59. El anticuerpo de la cláusula 5, 12 ó 25, que se une específicamente al epítipo 4 de IL1-R1.
- 60 60. Un método para representar en mapa epítipos de un antígeno seleccionado, que comprende:
- 65 (a) generar un conjunto de proteínas de fusión, en donde cada una de las proteínas de fusión comprende
 (i) avidina y
 (ii) un fragmento del antígeno;

- (b) rastrear el conjunto de proteínas de fusión en cuanto a la unión a uno o más participantes en la unión específicos para el antígeno;
- 5 (c) aislar las proteínas de fusión en un medio que comprende biotina, en donde la avidina se une a la biotina; y
- (d) analizar las proteínas de fusión unidas por parte del participante o los participantes en la unión específicos para determinar sitios de unión en el antígeno para el participante o los participantes en la unión específicos.
- 10 61. El método de la cláusula 60, en el que los participantes en la unión específicos son anticuerpos.

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> Amgen Inc. <120> Anticuerpo monoclonal anti-IL-1R1 humano terapéutico <130> EP34140IVH200pau	
	<140> todavía no asignado <141> 25-03-2010	
10	<150> 03 752 058.2 <151> 05-09-2003	
	<150> PCT/US2003/027978 <151> 05-09-2003	
15	<150> US 60/408.719 <151> 06-09-2002	
	<160> 89	
20	<170> PatentIn versión 3.0	
	<210> 1 <211> 990	
25	<212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 1 _	
	gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	60
	ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg	120
	tggaactcag gcgcccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca	180
	ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	240
	tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	300
	aaatcttctg acaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga	360
	ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct	420
	gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	480
	tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	540
	agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctcgcacc aggactggct gaatggcaag	600
	gagtacaagt gcaagggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	660
	aaagccaaag ggagccccg agaaccacag gtgtacacc tggcccatc ccgggatgag	720
	ctgaccaaga accagggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	780
	gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg	840
	ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	900
	cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	960
	cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa	990
30	<210> 2 <211> 330	
	<212> PRT <213> Homo sapiens	
35		

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

<210> 3

<211> 321

<212> ADN

ES 2 449 578 T3

<213> Homo sapiens

<400> 3
cgaaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
ggaactgcct ctgttggtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
tggaaggtgg ataacgcct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc acctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
agcttcaaca ggggagagtg t 321

5

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

10

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

15

<210> 5
 <211> 978
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20

<400>5
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgcctt gctccaggag cacctccgag 60
agcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
tggaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtcctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg cacccagacc 240

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 300
 aaatgtttg tcgagtgcc accgtgccc gaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc 360
 ctcttcccc caaaaccaa ggacacctc atgatctccc ggaccttga ggtcacgtgc 420
 gtggtggtg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc 480
 gtggaggtgc ataatgcca gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 540
 gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 600
 aaggtctcca acaaaggcct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa aaccaaaggg 660
 cagccccgag aaccacaggt gtacacctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 720
 caggtcagcc tgacctgct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg 780
 gagagcaatg ggagccgga gaacaactac aagaccacac ctccatgct ggactccgac 840
 ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 900
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 960
 tccctgtctc cgggtaaa 978

<210> 6
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 6
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

				165						170										175
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp					
			180					185					190							
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro					
		195					200					205								
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu					
	210					215					220									
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn					
	225				230					235					240					
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile					
				245					250					255						
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr					
			260					265					270							
Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys					
		275					280					285								
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys					
	290					295					300									
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu					
	305				310					315					320					
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys															
				325																

<210> 7
 <211> 981
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 7
 gccagcacca aggggccatc cgtcttcccc ctggcgcctt gctccaggag cacctccgag 60
 agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgctg 120
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagttc 300
 aaatatggtc ccccatgccc atcatgcca gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 360

 ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgagggtcacg 420
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540
 cgtgtgtgca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
 tgcaaggctc ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 660
 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat cccaggagga gatgaccaag 720
 aaccaggcca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc 840

gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta accgtgraca agagcaggtg gcaggagggg 900
aatgtcttct catgctccgt gakgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960
ctctccctgt ctctgggtaa a 981

<210> 8
<211> 327
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 9
 <211> 417
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens

<400> 9
 atggagtttg ggctgagctg ggtcttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtcctt gagactctcc 120
 tgtgcagcgt ctggattcac cttcagcaac tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
 ggcaaggggc tggagtgggt ggcaggcatt tggaatgatg gaattaataa ataccatgca 240
 cactccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
 caaatgaaca gcccgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agcacggtct 360
 ttcgactggc tattatttga gttctggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctagt 417

10 <210> 10
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 10
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Gly Ile Trp Asn Asp Gly Ile Asn Lys Tyr His Ala
 65 70 75 80
 His Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Pro Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Arg Ser Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Phe
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135

ES 2 449 578 T3

<210> 11
 <211> 384
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens

<400> 11
atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240
aggttcagtg gcagtggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggctccgct cactttcggc 360
ggagggacca aggtggagat caaa 384

10 <210> 12
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 12
Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro 1 5 10 15
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser 20 25 30
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser 35 40 45
Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro 50 55 60
Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala 65 70 75 80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser 85 90 95
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser 100 105 110
Asn Trp Pro Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 115 120 125

<210> 13
 <211> 417
 <212> ADN
 20 <213> Homo sapiens

<400> 13
atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtagc 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
 tgtgcagtgt ctggattcac cttcagtaac tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
 ggcaaggggc tggagtgggt ggcagctata tggaatgatg gagaaaataa acaccatgca 240
 ggctccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggacgatat 360
 tttgactggt tattatttga gtattggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctagt 417

5 <210> 14
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14

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

10 <210> 15
 <211> 411
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens

<400> 15
 atgggtcaa ccgccatcct cgccctcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgag 60
 gtgcagctga tgcagtctgg agcagaggtg aaaaagcccc gggagtctct gaagatctcc 120
 tgtaagggtt ctggatacag cttttccttc cactggatcg cctgggtgcg ccagatgccc 180
 gggaaaggcc tggagtggat ggggatcatc catcctggtg cctctgatac cagatacagc 240
 ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gccgacaact ccaacagcgc cacctacctg 300

cagtggagca gcctgaaggc ctcggacacc gccatgtatt tctgtgcgag acaaagggaa 360
 ctcgactact ttgactactg gggccagga accctggtca ccgtctctag t 411

5 <210> 16
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16

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

10 <210> 17
 <211> 378
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 17

atgtcgccat cacaactcat tgggtttctg ctgctctggg ttccagcctc caggggtgaa 60
 attgtgctga ctcagtctcc agactttcag tctgtgactc caaaggagaa agtcaccatc 120
 acctgccggg ccagtcagag cattggtagt agcttacact ggtaccagca gaaaccagat 180
 cagtctccaa agctcctcat caagtatgct tcccagtcct tctcaggggt cccctcgagg 240
 ttcagtgga gtggatctgg gacagatttc accctcacca tcaatagcct ggaagctgaa 300
 gatgctgcag cgtattactg tcatcagagt agtagtttac ctctcacttt cggcggaggg 360
 accaaggtgg agatcaaa 378

20 <210> 16
 <211> 126
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

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

5

<210> 19
 <211> 1407
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10

<400> 19
 atggagtttg ggctgagctg ggtcttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
 tgtgcagcgt ctggattcac cttcagcaac tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
 ggcaaggggc tggagtgggt ggcaggcatt tggaatgatg gaattaataa ataccatgca 240
 cactccgtga ggggcccatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
 caaatgaaca gcccagagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag agcacggctc 360
 ttcgactggc tattatttga gttctggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctagtggc 420
 tccaccaagg gcccacggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 480
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg 540
 aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 600
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggggcag ccagacctac 660
 atctgcaacg tgaatcaca gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 720
 tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 780
 tcagtcttcc ttttcccccc aaaaccaag gacaccctca tgatctcccg gacccttgag 840
 gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 900

15

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 960
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1020
 tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1080
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1140
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1200
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1260
 gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1380
 aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 1407

<210> 20
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 20
Met **Glu** **Phe** **Gly** **Leu** **Ser** **Trp** **Val** **Phe** **Leu** **Val** **Ala** **Leu** **Leu** **Arg** **Gly**
 1 5 10 15
Val **Gln** **Cys** **Gln** **Val** **Gln** **Leu** **Val** **Glu** **Ser** **Gly** **Gly** **Gly** **Val** **Val** **Gln**
 20 25 30
Pro **Gly** **Arg** **Ser** **Leu** **Arg** **Leu** **Ser** **Cys** **Ala** **Ala** **Ser** **Gly** **Phe** **Thr** **Phe**
 35 40 45
Ser **Asn** **Tyr** **Gly** **Met** **His** **Trp** **Val** **Arg** **Gln** **Ala** **Pro** **Gly** **Lys** **Gly** **Leu**
 50 55 60
Glu **Trp** **Val** **Ala** **Gly** **Ile** **Trp** **Asn** **Asp** **Gly** **Ile** **Asn** **Lys** **Tyr** **His** **Ala**
 65 70 75 80
His **Ser** **Val** **Arg** **Gly** **Arg** **Phe** **Thr** **Ile** **Ser** **Arg** **Asp** **Asn** **Ser** **Lys** **Asn**
 85 90 95
Thr **Leu** **Tyr** **Leu** **Gln** **Met** **Asn** **Ser** **Pro** **Arg** **Ala** **Glu** **Asp** **Thr** **Ala** **Val**
 100 105 110
Tyr **Tyr** **Cys** **Ala** **Arg** **Ala** **Arg** **Ser** **Phe** **Asp** **Trp** **Leu** **Leu** **Phe** **Glu** **Phe**
 115 120 125
Trp **Gly** **Gln** **Gly** **Thr** **Leu** **Val** **Thr** **Val** **Ser** **Ser** **Ala** **Ser** **Thr** **Lys** **Gly**
 130 135 140
Pro **Ser** **Val** **Phe** **Pro** **Leu** **Ala** **Pro** **Ser** **Ser** **Lys** **Ser** **Thr** **Ser** **Gly** **Gly**
 145 150 155 160
Thr **Ala** **Ala** **Leu** **Gly** **Cys** **Leu** **Val** **Lys** **Asp** **Tyr** **Phe** **Pro** **Glu** **Pro** **Val**
 165 170 175
Thr **Val** **Ser** **Trp** **Asn** **Ser** **Gly** **Ala** **Leu** **Thr** **Ser** **Gly** **Val** **His** **Thr** **Phe**
 180 185 190
Pro **Ala** **Val** **Leu** **Gln** **Ser** **Ser** **Gly** **Leu** **Tyr** **Ser** **Leu** **Ser** **Ser** **Val** **Val**
 195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 210 215 220
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 225 230 235 240
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 245 250 255
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 305 310 315 320
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 340 345 350
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 370 375 380
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460
 Leu Ser Pro Gly Lys
 465

- <210> 21
- <211> 1395
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

5

<400> 21
 atggagtttg ggctgagctg ggtcttcctc gttgctcttt taagagggtg ccagtgtcag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
 tgtgcagcgt ctggattcac cttcagcaac tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
 ggcaaggggc tggagtgggt ggcaggcatt tggaatgatg gaattaataa ataccatgca 240
 cactccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300

caaatgaaca gcccgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag agcacggctct 360
 ttcgactggc tattatttga gttctggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctagtgcc 420
 tccaccaagg gcccatcggc cttccccctg gcgcccctgct ccaggagcac ctccgagagc 480
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg 540
 aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga 600
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccttccagca acttcggcac ccagacctac 660
 acctgcaacg tagatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagacagt tgagcgcaaa 720
 tgttggtgag agtgcccacc gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttcttc 780
 tccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacgtgcgtg 840
 gtggtggagc tgagccacga agaccccgag gtccagtcca actggtacgt ggacggcgtg 900
 gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 960
 gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag 1020
 gtctccaaca aaggcctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag 1080
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag 1140
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggctt taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccatgctgga ctccgacggc 1260
 tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1380
 ctgtctccgg gtaaa 1395

<210> 22
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 22
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Gly Ile Trp Asn Asp Gly Ile Asn Lys Tyr His Ala
 65 70 75 80
 His Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Pro Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val

10

100					105					110					
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ala	Arg	Ser	Phe	Asp	Trp	Leu	Leu	Phe	Glu	Phe
		115					120					125			
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
	130					135					140				
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser
145					150					155					160
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val
				165					170					175	
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
			180					185					190		
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val
		195					200					205			
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val
	210					215					220				
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys
225					230					235					240
Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro
				245					250					255	
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
			260					265					270		
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
		275					280					285			
Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
	290					295					300				
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val
305					310					315					320
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
				325					330					335	
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
			340					345					350		
Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
		355					360					365			
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr
	370					375					380				
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
385					390					395					400
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu
				405					410					415	
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
			420					425					430		
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
		435					440					445			
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
	450					455					460				

**Lys
465**

5 <210> 23
 <211> 1398
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 23

atggagtttg ggctgagctg ggtcttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtcct gagactctcc 120
 tgtgcagcgt ctggattcac cttcagcaac tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
 ggcaaggggc tggagtgggt ggcaggcatt tggaatgatg gaattaataa ataccatgca 240
 cactccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
 caaatgaaca gcccgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag agcacggtct 360
 ttcgactggc tattatttga gttctggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctagtgcc 420
 agcaccaagg ggccatccgt cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 480
 acagccgccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540
 aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 600
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac gaagacctac 660
 acctgcaacg tagatcacia gccagcaac accaagggtg acaagagagt tgagtccaaa 720
 tatggtcccc catgccatc atgccagca cctgagttcc tggggggacc atcagtcttc 780
 ctgttcccc caaaaccaa ggacactctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 840
 gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc 900
 gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt 960
 gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 1020
 aaggctcca acaaaggcct cccgtcctcc atcgagaaa ccatctcaa agccaaaggg 1080
 cagccccgag agccacaggt gtacaccctg cccccatccc aggaggagat gaccaagaac 1140
 caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1260
 ggctccttct tcctctacag caggctaacc gtgracaaga gcagggtggca ggaggggaat 1320
 gtcttctcat gctccgtgak gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc 1380
 tccctgtctc tgggtaaa 1398

10 <210> 24
 <211> 466
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 24

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Gly Ile Trp Asn Asp Gly Ile Asn Lys Tyr His Ala
 65 70 75 80
 His Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Pro Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Arg Ser Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Phe
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 145 150 155 160
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 210 215 220
 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
 225 230 235 240
 Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly
 245 250 255
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 260 265 270
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
 275 280 285
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365
 Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 370 375 380
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
 420 425 430
 Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 450 455 460

Gly Lys
 465

<210> 25
 <211> 1407
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 25
 atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
 tgtgcagtgt ctggattcac cttcagtaac tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
 ggcaaggggc tggagtgggt ggcagctata tggaatgatg gagaaaataa acaccatgca 240
 ggctccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggacgatat 360
 tttgactggt tattatttga gtattggggc caggggaacc tggtcaccgt ctctagtgcc 420
 tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 480
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540
 aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 600
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggggcac ccagacctac 660
 atctgcaacg tgaatcaca gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 720
 tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 780
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 840
 gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 900
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 960
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1020
 tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1080

gccaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1140
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1200
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1260
 gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1380
 aagagcctct cctgtctcc gggtaaa 1407

<210> 26
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 26

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

10

ES 2 449 578 T3

			245						250				255		
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
			260					265					270		
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
		275					280					285			
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
	290					295					300				
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser
305					310					315					320
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
			325						330					335	
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala
			340					345					350		
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro
		355					360					365			
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln
	370					375					380				
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala
385					390					395					400
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr
				405					410					415	
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu
			420					425					430		
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser
		435					440					445			
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser
	450					455					460				
Leu	Ser	Pro	Gly	Lys											
465															

<210> 27
 <211> 1395
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagagggtg ccagtgtcag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtcctt gagactctcc 120
 tgtgcagtgt ctggattcac cttcagtaac tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
 ggcaaggggc tggagtgggt ggcagctata tggaatgatg gagaaaataa acaccatgca 240
 ggctccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggacgatat 360
 tttgactggt tattatttga gtattggggc caggggaacc tggtcacctg ctctagtgcc 420
 tccaccaagg gcccatcgggt cttccccctg gcgccttctt ccaggagcac ctccgagagc 480

10

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540
 aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga 600
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca acttcggcac ccagacctac 660
 acctgcaacg tagatcaciaa gcccagcaac accaagggtg acaagacagt tgagcgcaaa 720
 tgttgtgtcg agtgcccacc gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttctc 780
 tccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacgtgcgtg 840
 gtggtggacg tgagccacga agaccccag gtcacgttca actggtacgt ggacggcgtg 900
 gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 960
 gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag 1020
 gtctccaaca aaggcctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag 1080
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag 1140
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccatgctgga ctccgacggc 1260
 tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1380
 ctgtctccgg gtaaa 1395

<210> 28
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 28
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Ala Ile Trp Asn Asp Gly Glu Asn Lys His His Ala
 65 70 75 80
 Gly Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Tyr Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Tyr
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 145 150 155 160
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205
 Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 210 215 220
 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys
 225 230 235 240
 Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
 245 250 255
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 260 265 270
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 275 280 285
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 290 295 300
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val
 305 310 315 320
 Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 325 330 335
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 340 345 350
 Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 355 360 365
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 370 375 380
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 385 390 395 400
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu
 405 410 415
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 420 425 430
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 435 440 445
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 450 455 460
 Lys
 465

<210> 29
 <211> 1398
 <212> ADN

ES 2 449 578 T3

<213> Homo sapiens

<400> 29

```

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag      60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc      120
tgtgcagtgt ctggattcac cttcagtaac tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca      180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcagctata tggaatgatg gagaaaataa acaccatgca      240
ggctccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg      300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgctgag aggacgatat      360
tttgactggt tattatttga gtattggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctagtgcc      420
agcaccaagg ggccatccgt cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc      480
acagccgccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg      540

aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga      600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac gaagacctac      660
acctgcaacg tagatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagagagt tgagtccaaa      720
tatgggtccc catgcccata atgccagca cctgagttcc tggggggacc atcagtcttc      780
ctgttcccc caaaaccaa ggacactctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc      840
gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc      900
gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt      960
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc     1020
aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg     1080
cagccccgag agccacaggt gtacaccctg cccccatccc aggaggagat gaccaagaac     1140
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg     1200
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac     1260
ggctccttct tcctctacag caggctaacc gtgracaaga gcaggtggca ggaggggaat     1320
gtcttctcat gctccgtgak gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc     1380
tcctgtctc tgggtaaa                                     1398

```

5

<210> 30
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 30

```

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1           5           10           15
Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
           20           25           30

```

15

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Ala Ile Trp Asn Asp Gly Glu Asn Lys His His Ala
 65 70 75 80
 Gly Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Tyr Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Tyr
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 145 150 155 160
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 210 215 220
 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
 225 230 235 240
 Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly
 245 250 255
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 260 265 270
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
 275 280 285
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 340 345 350
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365
 Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 370 375 380
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

385	390	395	400
Glu Ser Asn Gly	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
	405	410	415
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp			
	420	425	430
Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
	435	440	445
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu			
	450	455	460

Gly Lys
465

- <210> 31
- <211> 1401
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

5

```

<400> 31
atgggggtcaa cgcccatcct cgccctcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgag    60
gtgcagctga tgcagtctgg agcagaggtg aaaaagcccg gggagtctct gaagatctcc    120
tgtaaggggt ctggatacag cttttccttc cactggatcg cctgggtgcg ccagatgcc    180
gggaaaggcc tggagtggat ggggatcatc catcctggtg cctctgatac cagatacagc    240
ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gccgacaact ccaacagcgc cacctacctg    300
cagtggagca gcctgaaggc ctcggacacc gccatgtatt tctgtgcgag acaaaggaa    360
ctcgactact ttgactactg gggccaggga accctggtca ccgtctctag tgcctccacc    420
aagggcccat cggctctccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg    480
gccctgggct gcctgggtaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca    540
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac    600
tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc    660
aacgtgaatc acaagccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt    720
gacaaaactc acacatgcc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc    780
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca    840
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac    900
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac    960
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag   1020
tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa   1080
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag   1140
aaccaggcca gcctgacctg cctgggcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag   1200
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc   1260
gacggctcct tcttcctcta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg   1320
    
```

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
 ctctccctgt ctccgggtaa a 1401

5 <210> 32
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 32

Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala Leu Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly
 1 5 10 15
 Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Met Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45
 Ser Phe His Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Met Gly Ile Ile His Pro Gly Ala Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
 65 70 75 80
 Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Asn Ser
 85 90 95
 Ala Thr Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
 100 105
 Tyr Phe Cys Ala Arg Gln Arg Glu Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285

10

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly val Glu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460
 Pro Gly Lys
 465

<210> 33
 <211> 1389
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 33

atgggggtaa ccgccatcct cgccctcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgag 60
 gtgcagctga tgcagctctgg agcagaggtg aaaaagccc gggagtctct gaagatctcc 120
 tgtaagggtt ctggatacag cttttccttc cactggatcg cctgggtgcg ccagatgccc 180
 gggaaaggcc tggagtggat ggggatcatc catcctggtg cctctgatac cagatacagc 240
 ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gccgacaact ccaacagcgc cacctacctg 300
 cagtggagca gcctgaaggc ctcggacacc gccatgtatt tctgtgagag acaaagggaa 360
 ctcgactact ttgactactg gggccagggg accctgggtca ccgtctctag tgccctccacc 420
 aaggggccat cggctcttccc cctggcgcgc tgctccagga gcacctccga gagcacagcg 480
 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca 540
 ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc ccagctgtcc tacagtcttc aggactctac 600
 tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcaacttcg gcacccagac ctacacctgc 660

10

aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga cagttgagcg caaatgttgt 720
 gtcgagtgcc caccgtgccc agcaccacct gtggcaggac cgtcagtctt cctcttcccc 780
 ccaaaacca aggacacct catgatctcc cggaccctg aggtcacgtg cgtggtggtg 840
 gacgtgagcc acgaagacct cgaggtccag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 900
 cataatgcca agacaaagcc acgggaggag cagttcaaca gcacgttccg tgtggtcagc 960
 gtcctcaccg ttgtgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1020
 aacaaaggcc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aaaccaaagg gcagccccga 1080
 gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1140
 ctgacctgcc tggtaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1200
 gggcagccgg agaacaacta caagaccaca cctcccatgc tggactccga cggctccttc 1260
 ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320
 tgctccgtga tgcattgggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1380
 ccgggtaaa 1389

<210> 34
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 34

Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala Leu Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly
 1 5 10 15
 Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Met Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45
 Ser Phe His Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Met Gly Ile Ile His Pro Gly Ala Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
 65 70 75 80
 Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Asn Ser
 85 90 95
 Ala Thr Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Arg Gln Arg Glu Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175

10

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205
 Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 210 215 220
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys
 225 230 235 240
 Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
 245 250 255
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 260 265 270
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 275 280 285
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 290 295 300
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
 305 310 315 320
 Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 325 330 335
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 340 345 350
 Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 355 360 365
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 370 375 380
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 385 390 395 400
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
 405 410 415
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 420 425 430
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 435 440 445
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 35
 <211> 1392
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 35

atgggggtcaa ccgccatcct cgccctcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgag 60
 gtgcagctga tgcagtctgg agcagaggtg aaaaagcccg gggagtctct gaagatctcc 120
 tgtaaggggt ctggatacag cttttccttc cactggatcg cctgggtgcg ccagatgccc 180

```

gggaaaggcc tggagtggat ggggatcatc catcctgggtg cctctgatac cagatacagc 240
ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gccgacaact ccaacagcgc cacctacctg 300
cagtggagca gcctgaaggc ctcggacacc gccatgtatt tctgtgcgag acaaagggaa 360
ctcgactact ttgactactg gggccagggg accctgggtca ccgtctctag tgccagcacc 420
aagggggccat ccgtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcc 480
gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 540
ggcgccttga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 600
tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacgaagac ctacacctgc 660
aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagtc caaatatggt 720
cccccatgcc catcatgcc agcacctgag ttcttggggg gacctcagt cttctgttc 780
cccccaaac ccaaggacac tctcatgatc tcccggacc ctgaggtcac gtgcgtgggtg 840
gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag 900
gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc 960
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1020
tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag aaaacctct ccaaagcaa agggcagccc 1080
cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccaggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1140
agcctgacct gcctgggtcaa aggcttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1260
ttcttctct acagcaggct aaccgtgrac aagagcaggt ggcaggaggg gaatgtcttc 1320
tcatgtctcg tgakgcatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctcctg 1380
tctctgggta aa 1392

```

```

<210> 36
<211> 464
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```
<400> 36
```

```

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

```

Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Asn Ser
 85 90 95
 Ala Thr Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
 100 105
 Tyr Phe Cys Ala Arg Gln Arg Glu Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 210 215 220
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 225 230 235 240
 Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser
 245 250 255
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 260 265 270
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 275 280 285
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 290 295 300
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 305 310 315 320
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 325 330 335
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 340 345 350
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 355 360 365
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 370 375 380
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

435 440 445
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
450 455 460
 <210> 37
 <211> 705
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 37
 atggaagccc cagctcagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
 ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctccgct cactttcggc 360
 ggagggacca aggtggagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 420
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaaactcc 540
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 600
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 660
 10 ggctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacagggggag agtgt 705
 <210> 38
 <211> 235
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 38
Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45
Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60
Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65 70 75 80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
100 105 110

Asn Trp Pro Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 130 135 140
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 145 150 155 160
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 165 170 175
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 180 185 190
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 195 200 205
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 210 215 220
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

5 <210> 39
 <211> 699
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 atgtcgccat cacaactcat tgggtttctg ctgctctggg ttccagcctc caggggtgaa 60
 attgtgctga ctcagtctcc agactttcag tctgtgactc caaaggagaa agtcaccatc 120
 acctgccggg ccagtcagag cattggtagt agcttacact ggtaccagca gaaaccagat 180
 cagtctcaa agctcctcat caagtatgct tcccagtcct tctcaggggt cccctcgagg 240
 ttcagtgcca gtggatctgg gacagatttc accctacca tcaatagcct ggaagctgaa 300
 gatgctgcag cgtattactg tcatcagagt agtagtttac ctctcacttt cggcggaggg 360
 accaaggtgg agatcaaacg aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 420
 gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 480
 agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 540
 agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 600
 agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgctgagc aagtcacca tcagggcctg 660
 10 agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgt 699

15 <210> 40
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 40
 Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
 1 5 10 15

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

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

<400> 41

Leu Ser Asp Ile Ala
 1 5

<210> 42
 <211> 4
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42
 Val Ile Asp Glu
 1

<210> 43
 <211> 4

	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 43	
5	Thr Cys Phe Ala	
	1	
	<210> 44	
	<211> 24	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para PCR	
15	<220>	
	<221> característica miscelánea	
	<222> (18) ... (23)	
	<223> n es a, c, t o g	
20	<400> 44	
	ggccggatag gcctccannn nnnt	24
	<210> 45	
25	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> cebador de oligonucleótidos para PCR	
	<400> 45	
	ggacactgac atggactgaa ggagta	26
35	<210> 46	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para PCR	
	<400> 46	
45	ggacactgac atggactgaa ggagta	26
	<210> 47	
	<211> 46	
50	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótidos para PCR	
55	<400> 47	
	cagcagaagc ttctagacca ccatgctgcc atcacaactc attggg	46

<210> 48
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> cebador de oligonucleótidos para PCR
 <400> 48
 10
cttgtcga^{ct} caa^{ct}ctc^c ccctgttgaa gctc **34**
 <210> 49
 <211> 8
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos codificada por el cebador kappa 5' anti-IL-1R1 15C4
 20 <400> 49
Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly
1 5
 25 <210> 50
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos codificada por el cebador kappa 3' anti-IL-1R1 15C4
 <400> 50
Cys Glu Gly Arg Asn Phe Ser
1 5
 35 <210> 51
 <211> 1409
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 51

tctagaccac catggacatc aggctcagct tagttttcct tgtccttttc ataaaagggtg 60
 tccagtgtga ggtagaactg gtggagtctg ggggcggtt agtacaacct ggaagggtcca 120
 tgacactctc ctgtgcagcc tcgggattca ctttcagAAC ctatggcatg gcctgggtcc 180
 gccaggcccc aacgaaggggt ctggagtggg tctcatcaat tactgctagt ggtggtacca 240
 cctactatcg agactccgtg aagggccgct tcactatttt tagggataat gcaaaaagta 300
 ccctatacct gcagatggac agtccgaggt ctgaggacac ggccacttat ttctgtacat 360
 caatttcgga atactggggc cacggagtca tggtcaccgt ctctagtgcc tccaccaagg 420
 gcccacggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc acagcggccc 480
 tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg aactcaggcg 540
 ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga ctctactccc 600
 tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac atctgcaacg 660
 tgaatcaca gcccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagcccaa tcttgtgaca 720
 aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc 780
 tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag gtcacatgcg 840
 tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg 900
 tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg 960
 tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca 1020
 aggtctcaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc 1080
 agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg accaagaacc 1140
 aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg 1200
 agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg 1260
 gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg 1320
 tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgag aagagcctct 1380
 ccctgtctcc gggtaaatga taagtcgac 1409

5 <210> 52
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador de oligonucleótidos para PCR
 <400> 52

tgaggacgct gaccacagc 19

15 <210> 53
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador de oligonucleótidos para PCR

<400> 53

cagcagaagc ttctagacca ccatgggggc aaccgccatc ctcg **44**

5

<210> 54
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> cebador de oligonucleótidos para PCR

<400> 54

15

gtggaggcac tagagacggt gaccagggtt cc **32**

<210> 55
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos codificada por el cebador de la cadena pesada 5' anti-IL-1R1 15C4

25

<400> 55

Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu
1 5

30

<210> 56
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

35

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos codificada por el cebador de la cadena pesada 3' anti-IL-1R1 15C4

<400> 56

Thr Ser Ala Ser Ser Val Thr Val Leu Thr Gly
1 5 10

40

<210> 57
 <211> 1415
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

45

<400> 57

tctagaccac catggacatg aggggtccccg ctcagctcct ggggctcctg ctattgtggt 60
 tgagaggtgc cagatgtgag gtccagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtacatcctg 120
 gggggtcctt gagactctcc tgtgcaggct ctggattcac cttcagtggc catgctttgc 180
 actgggttcg ccaggctcca ggaaaaggct tggagtgggt atcaggattt ggtactcatg 240
 gtgggacata ctatgcagac tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcca 300
 agaactcctt gtttcttcaa atgaacagcc tgagcgccga ggacatggct gtgtattact 360
 gtacaagaag aaactgggga caatttgact actggggcca gggaaacctg gtcaccgtct 420
 ctagtgcctc caccaagggc ccatcggctt tccccctggc gccctgctcc aggagcacct 480
 ccgagagcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg 540
 tgtcgtggaa ctcaggcgtc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtcctacagt 600
 cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcaac ttcggcacc 660
 agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaacac caagggtggac aagacagttg 720
 agcgcaaatg ttgtgtcgag tgcccaccgt gccagcacc acctgtggca ggaccgtcag 780
 tcttctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca 840
 cgtgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg 900
 acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccacggga ggagcagttc aacagcacgt 960
 tccgtgtggt cagcgtcctc accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca 1020
 agtgcaaggt ctccaacaaa ggcctcccag cccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca 1080
 aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag gagatgacca 1140
 agaaccaggt cagcctgacc tgcttggctc aaggcttcta ccccagcgac atcgccgtgg 1200
 agtgggagag caatgggag ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact 1260
 ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg 1320
 ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac acgcagaaga 1380
 gcctctcctt gtctccgggt aaatgataag tcgac 1415

<210> 58
 <211> 1418
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 58

tctagaccac catggacatg aggggtccccg ctcagctcct ggggctcctg ctattgtggt 60
 tgagaggtgc cagatgtgag gtccagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtacatcctg 120
 gggggtcctt gagactctcc tgtgcaggct ctggattcac cttcagtggc catgctttgc 180
 actgggttcg ccaggctcca ggaaaaggct tggagtgggt atcaggattt ggtactcatg 240
 gtgggacata ctatgcagac tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcca 300
 agaactcctt gtttcttcaa atgaacagcc tgagcgccga ggacatggct gtgtattact 360

gtacaagaag aaactgggga caatttgact actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct 420
ctagtgccag caccaagggg ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct 480
ccgagagcac agccgccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg 540
tgtcgtggaa ctgaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt 600
cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttggggcacga 660
agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagttg 720
agtccaaata tgggtcccca tgcccatcat gccagcacc tgagttcctg gggggaccat 780
cagtcttctt gttcccccca aaaccaagg aactctcat gatctcccgg acccctgagg 840
tcacgtgcgt ggtggtggac gtgagccagg aagaccccga ggtccagttc aactggtacg 900
tggatggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgag ggaggagcag ttcaacagca 960
cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt 1020
acaagtgcaa ggtctccaac aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc atctccaaag 1080
ccaaagggca gccccgagag ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccag gaggagatga 1140
ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg 1200
tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg 1260
actccgacgg ctcttcttct ctctacagca ggctaaccgt ggacaagagc aggtggcagg 1320
aggggaatgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga 1380
agagcctctc cctgtctctg ggtaaatgat aagtcgac 1418

<210> 59
<211> 485
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59

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

10

Gly Lys Glu Val Leu Lys Thr Met Trp Leu Leu Arg Ser Ser Val Asn
 115 120
 Asp Ile Gly Asp Asp Trp Lys Ala Thr Arg Val Gly Ile Asn Ile Phe
 130 135 140
 Thr Arg Leu Arg Thr Gln Lys Glu Gln Leu Leu Ala Ser Leu Leu Glu
 145 150 155 160
 Ala Asp Lys Cys Lys Glu Arg Glu Glu Lys Ile Ile Leu Val Ser Ser
 165 170 175
 Ala Asn Glu Ile Asp Val Arg Pro Cys Pro Leu Asn Pro Asn Glu His
 180 185 190
 Lys Gly Thr Ile Thr Trp Tyr Lys Asp Asp Ser Lys Thr Pro Val Ser
 195 200 205
 Thr Glu Gln Ala Ser Arg Ile His Gln His Lys Glu Lys Leu Trp Phe
 210 215 220
 Val Pro Ala Met Val Glu Asp Ser Gly His Tyr Tyr Cys Val Val Arg
 225 230 235 240
 Asn Ser Ser Tyr Cys Leu Arg Ile Lys Ile Ser Ala Lys Phe Val Glu
 245 250 255
 Asn Glu Pro Asn Leu Cys Tyr Asn Ala Gln Ala Ile Phe Lys Gln Lys
 260 265 270
 Leu Pro Val Ala Gly Asp Gly Gly Leu Val Cys Pro Tyr Met Glu Phe
 275 280 285
 Phe Lys Asn Glu Asn Asn Glu Leu Pro Lys Leu Gln Trp Tyr Lys Asp
 290 295 300
 Cys Lys Pro Leu Leu Leu Asp Asn Ile His Phe Ser Gly Val Lys Asp
 305 310 315 320
 Arg Leu Ile Val Met Asn Val Ala Glu Lys His Arg Gly Asn Tyr Thr
 325 330 335
 Cys His Ala Ser Tyr Thr Tyr Leu Gly Lys Gln Tyr Pro Ile Thr Arg
 340 345 350
 Val Ile Glu Phe Ile Thr Leu Glu Glu Asn Lys Pro Thr Arg Pro Val
 355 360 365
 Ile Val Ser Pro Ala Asn Glu Thr Met Glu Val Asp Leu Gly Ser Gln
 370 375 380
 Ile Gln Leu Ile Cys Asn Val Thr Gly Gln Leu Ser Asp Ile Ala Tyr
 385 390 395 400
 Trp Lys Trp Asn Gly Ser Val Ile Asp Glu Asp Asp Pro Val Leu Gly
 405 410 415
 Glu Asp Tyr Tyr Ser Val Glu Asn Pro Ala Asn Lys Arg Arg Ser Thr
 420 425 430
 Leu Ile Thr Val Leu Asn Ile Ser Glu Ile Glu Ser Arg Phe Tyr Lys
 435 440 445
 His Pro Phe Thr Cys Phe Ala Lys Asn Thr His Gly Ile Asp Ala Ala
 450 455 460
 Tyr Ile Gln Leu Ile Tyr Pro Val Thr Asn Phe Gln Lys Asp Tyr Lys
 465 470 475 480

Asp Asp Asp Asp Lys
485

5 <210> 60
<211> 485
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> proteína quimérica de avidina-cinomolgo IL-1R1-FLAG

<400> 60

Met Val His Ala Thr Ser Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15
Ala Leu Val Ala Pro Gly Leu Ser Ala Arg Lys Cys Ser Leu Thr Gly
20 25 30
Lys Trp Thr Asn Asp Leu Gly Ser Asn Met Thr Ile Gly Ala Val Asn
35 40 45
Ser Lys Gly Glu Phe Thr Gly Thr Tyr Thr Thr Ala Val Thr Ala Thr
50 55 60
Ser Asn Glu Ile Lys Glu Ser Pro Leu His Gly Thr Gln Asn Thr Ile
65 70 75 80
Asn Lys Arg Thr Gln Pro Thr Phe Gly Phe Thr Val Asn Trp Lys Phe
85 90 95
Ser Glu Ser Thr Thr Val Phe Thr Gly Gln Cys Phe Ile Asp Arg Asn
100 105 110
Gly Lys Glu Val Leu Lys Thr Met Trp Leu Leu Arg Ser Ser Val Asn
115 120 125
Asp Ile Gly Asp Asp Trp Lys Ala Thr Arg Val Gly Ile Asn Ile Phe
130 135 140
Thr Arg Leu Arg Thr Gln Lys Glu Gln Leu Leu Ala Ser Leu Leu Glu
145 150 155 160
Ala Asp Lys Cys Asn Glu Arg Glu Glu Lys Ile Ile Leu Val Ser Ser
165 170 175
Ala Asn Glu Ile Asp Val Arg Pro Cys Pro Leu Asn Pro Asn Glu Tyr
180 185 190
Lys Gly Thr Ile Thr Trp Tyr Lys Asn Asp Ser Lys Thr Pro Ile Ser
195 200 205
Thr Glu Gln Ala Ser Arg Ile His Gln His Lys Lys Lys Leu Trp Phe
210 215 220
Val Pro Ala Lys Val Glu Asp Ser Gly His Tyr Tyr Cys Val Val Arg
225 230 235 240
Asn Ser Ser Tyr Cys Leu Arg Ile Lys Ile Thr Ala Lys Phe Val Glu
245 250 255
Asn Glu Pro Asn Leu Cys Tyr Asn Ala Glu Ala Ile Phe Lys Gln Arg
260 265 270

Leu Pro Val Ala Gly Asp Gly Gly Leu Val Cys Pro Tyr Met Glu Phe
 275 280 285
 Phe Lys Asp Glu Asn Asn Glu Leu Pro Lys Leu Leu Trp Tyr Lys Asp
 290 300
 Cys Lys Pro Leu Leu Leu Asp Asn Ile His Phe Ser Gly Val Lys Asp
 305 310 315 320
 Arg Leu Ile Val Met Asn Val Ala Glu Lys His Arg Gly Asn Tyr Thr
 325 330 335
 Cys His Ala Ser Tyr Thr Tyr Leu Gly Lys Gln Tyr Pro Ile Thr Arg
 340 345 350
 Val Ile Glu Phe Ile Thr Leu Glu Glu Asn Lys Pro Thr Arg Pro Val
 355 360 365
 Ile Val Ser Pro Ala Asn Glu Thr Ile Glu Val Asp Leu Gly Ser Gln
 370 375 380
 Ile Gln Leu Ile Cys Asn Val Thr Gly Gln Leu Ser Asp Thr Ala Tyr
 385 390 395 400
 Trp Lys Trp Asn Gly Ser Phe Ile Asp Glu Asp Asp Pro Val Leu Gly
 405 410 415
 Glu Asp Tyr Tyr Ser Val Glu Asn Pro Ala Asn Lys Arg Arg Ser Thr
 420 425 430
 Leu Ile Thr Val Leu Asn Ile Ser Glu Thr Glu Ser Arg Phe Tyr Lys
 435 440 445
 His Pro Phe Thr Cys Leu Ala Arg Asn Thr His Gly Met Asp Ala Ala
 450 455 460
 Tyr Val Gln Leu Ile Tyr Pro Val Thr Lys Phe Gln Lys Asp Tyr Lys
 465 470 475 480
 Asp Asp Asp Asp Lys
 485

5 <210> 61
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 61
Asn Tyr Gly Met His
1 5

15 <210> 62
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 62
Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met His
1 5

<210> 63

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 63
Phe His Trp Ile Ala
1 5

<210> 64
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 64
Gly Ile Trp Asn Asp Gly Ile Asn Lys Tyr His Ala His Ser Val Arg
1 5 10 15

15 **Gly**
 <210> 65
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 65
Ala Ile Trp Asn Asp Gly Glu Asn Lys His His Ala Gly Ser Val Arg
1 5 10 15

25 **Gly**
 <210> 66
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 66
Ile Ile His Pro Gly Ala Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

35 **Gly**
 <210> 67
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 67
Ala Arg Ser Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Phe
1 5 10

45 <210> 68
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 68

Gly Arg Tyr Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Tyr
1 5 10

5 <210> 69
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 69

Gln Arg Glu Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

15 <210> 70
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 70

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

25 <210> 71
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 71

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His
1 5 10

30 <210> 72
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 72

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

40 <210> 73
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 73

Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser
1 5

50 <210> 74
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 74

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Leu Thr
1 5 10

5 <210> 75
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 75

His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Leu Thr
1 5

15 <210> 76
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 76

Pro Val Ile Val Ser Pro Ala Asn Glu Thr Met Glu Val Asp Leu Gly
1 5 10 15

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

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

Leu Gly Glu Asp Tyr Tyr Ser Val Glu Asn Pro Ala Asn Lys Arg Arg
50 55 60

Ser Thr Leu Ile Thr Val Leu Asn Ile Ser Glu Ile Glu Ser Arg Phe
65 70 75 80

Tyr Lys His Pro Phe Thr Cys Phe Ala Lys Asn Thr His Gly Ile Asp
85 90 95

Ala Ala Tyr Ile Gln Leu Ile Tyr Pro Val Thr Asn Phe Gln Lys
100 105 110

25 <210> 77
 <211> 350
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 77

30 **cctgtgattg tgagcccagc taatgagaca atggaagtag acttgggatc ccagatacaa 60**
ttgatctgta atgtcaccgg ccagttgagt gacattgctt actggaagtg gaatgggtca 120
gtaattgatg aagatgacct agtgctaggg gaagactatt acagtgtgga aaatcctgca 180
aacaaaagaa ggagtacct catcacagtg cttaatatat cggaaattga aagtagattt 240
tataaacatc catttacctg ttttgccaag aatacacatg gtatagatgc agcatatatc 300
cagttaatat atccagtcac taatttccag aagcacatga ttggtatag 350

<210> 78

ES 2 449 578 T3

<211> 350
 <212> ADN
 <213> Rattus sp.

5 <400> 78
cctgtgatta tgagcccacg gaatgagacg atggaagctg acccaggatc cacgatacaa 60
ctgatctgca acgtcacggg ccagttcacc gaccttgtct actggaagtg gaatgggtcg 120
gaaattgaat gggacgatcc aatcctagcc gaagactatc agtttttggg acacccttca 180
gccaaaagaa agtacactct cattacaaca cttaacgttt cagaggtcaa aagccagttt 240
tatcgctatc cgttcatctg cttcgttaag aacctcata ttctggagac tgcacacgta 300
cggttagtat acccagttcc tgacttcaag aattacctca tcgggggctt 350

10 <210> 79
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

15 <400> 79
Pro Val Ile Met Ser Pro Arg Asn Glu Thr Met Glu Ala Asp Pro Gly
1 5 10 15
Ser Thr Ile Gln Leu Ile Cys Asn Val Thr Gly Gln Phe Thr Asp Leu
20 25 30
Val Tyr Trp Lys Trp Asn Gly Ser Glu Ile Glu Trp Asp Asp Pro Ile
35 40 45
Leu Ala Glu Asp Tyr Gln Phe Leu Glu His Pro Ser Ala Lys Arg Lys
50 55 60
Tyr Thr Leu Ile Thr Thr Leu Asn Val Ser Glu Val Lys Ser Gln Phe
65 70 75 80
Tyr Arg Tyr Pro Phe Ile Cys Phe Val Lys Asn Thr His Ile Leu Glu
85 90 95
Thr Ala His Val Arg Leu Val Tyr Pro Val Pro Asp Phe Lys Lys
100 105 110

20 <210> 80
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 80

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

<210> 81
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 81

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

<210> 82
 <211> 120

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 82

5

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

<210> 83
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 83

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

15

85

90

95

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

<210> 84
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 84

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

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

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Gly Ile Trp Asn Asp Gly Ile Asn Lys Tyr His Ala His Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Pro Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ala Arg Ser Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Phe Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 85
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15

<400> 85

gaggtgcagc tgatgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggata cagcttttcc ttccactgga tcgcctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atccatcctg gtgcctctga taccagatac 180
 agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca actccaacag cgccacctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt atttctgtgc gagacaaagg 300
 gaactcgact actttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc tagt 354

20

<210> 86

ES 2 449 578 T3

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

5 <400> 86
gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60
atcacctgcc gggccagtca gagcattggt agtagcttac actggtacca gcagaaacca 120
gatcagtctc caaagctcct catcaagtat gcttcccagt ccttctcagg ggtcccctcg 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240
gaagatgctg cagcgtatta ctgtcatcag agtagtagtt tacctctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

10 <210> 87
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <400> 87
cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag tgtctggatt caccttcagt aactatggca tgcaactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagct atatggaatg atggagaaaa taaacacat 180
gcaggctccg tgaggggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaggacga 300
tattttgact ggttattatt tgagtattgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctctagt 360

20 <210> 88
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25 <400> 88
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agtacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctccgct cactttcggc 300
ggagggacca aggtggagat caaa 324

30 <210> 89
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 89

ES 2 449 578 T3

caggTgcagc Tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagc aactatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcaggc atttggaatg atggaattaa taaataccat 180
gcacactccg tgaggggccc attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcccgag agccgaggac ac̄gḡctgtgt attactgtḡc gagagcacgg 300
tctttcgact ggctattatt tgagttctgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctctagt 360

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humano aislado que se une específicamente al receptor de interleucina 1 de tipo 1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:
- 5 a. regiones de armazón de la cadena pesada humana, una región CDR1 de la cadena pesada, en donde la región CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, una región CDR2 de la cadena pesada, en donde la región CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64 y una región CDR3 de la cadena pesada, en donde la región CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67; y
- 10 b. regiones de armazón de la cadena ligera humana, una región CDR1 de la cadena ligera, en donde la región CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70, una región CDR2 de la cadena ligera, en donde la región CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72 y una región CDR3 de la cadena ligera, en donde la región CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74.
- 15
2. Un anticuerpo humano aislado que se une específicamente al receptor de interleucina 1 de tipo 1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:
- 20 a. regiones de armazón de la cadena pesada humana, una región CDR1 de la cadena pesada, en donde la región CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62, una región CDR2 de la cadena pesada, en donde la región CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y una región CDR3 de la cadena pesada, en donde la región CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68; y
- 25 b. regiones de armazón de la cadena ligera humana, una región CDR1 de la cadena ligera humana, en donde la región CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70, una región CDR2 de la cadena ligera, en donde la región CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72 y una región CDR3 de la cadena ligera, en donde la región CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74.
- 30
3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos
- 35 **QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAVSGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWNDGE**
NKHHAGSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRYFDWLLFEYWGQG T
LVTVSS, y una cadena ligera que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos
- EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA**
RFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGKVEIK.
- 40
4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos
- 45 **QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAGIWN DGI**
NKYHAHSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSPRAEDTAVYYCARAR SFDWLLFEFWGQGT
LVTVSS, y una cadena ligera que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos
- EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA**
RFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGKVEIK.
5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la cadena pesada y la cadena ligera están conectadas mediante un enlazador flexible para formar un anticuerpo de cadena sencilla.
- 50
6. El anticuerpo de la reivindicación 5, que es un anticuerpo Fv de cadena sencilla.
7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un anticuerpo Fab, un anticuerpo Fab' o

un anticuerpo (Fab')₂.

- 5
8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano.
9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un anticuerpo IgG2.
- 10
10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que se une específicamente al polipéptido de SEQ ID NO: 76.
11. El anticuerpo de la reivindicación 10, que se une específicamente a la secuencia de aminoácidos YSV.
12. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 15
13. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 12.
14. Una célula hospedadora que contiene el vector de expresión de la reivindicación 13.
- 20
15. Un método para preparar el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende las etapas de:
- 25
- a) insertar en un vector de expresión la molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena pesada, una región variable de la cadena pesada, una región constante de la cadena ligera o una región variable de la cadena ligera del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10;
- b) introducir el vector de expresión en una célula hospedadora para expresar el gen; y
- 30
- c) aislar el anticuerpo.
- 35
16. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por IL-1 en un paciente, en donde la enfermedad mediada por IL-1 se selecciona de enfermedad pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o EPOC, proteínosis alveolar pulmonar, neumopatía inducida por bleomicina, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis pulmonar inducida por radiación, fibrosis quística, acumulación de colágeno en los pulmones, síndrome del distrés respiratorio agudo o ARDS, displasia bronquio-pulmonar o BPD, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas seleccionadas de enfisema y bronquitis crónica, enfermedad pulmonar fibrótica crónica, asbestosis, pneumoconiosis del trabajador del carbón, silicosis, bronquiolitis obliterante con neumonía organizada, sarcoidosis pulmonar, rinitis alérgica, dermatitis de contacto, dermatitis atópica, diabetes, enfermedad del intestino inflamatorio, artritis reumatoide y asma.
- 40
17. Una composición farmacéutica que comprende un soporte farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

FIG. 1A

Región Constante de IgG1 de la Cadena Pesada

gcctccacca	agggcccatc	ggtcttcccc	ctggcaccct	cctccaagag	cacctctggg	60
ggcacagcgg	ccctgggctg	cctggtaag	gactacttcc	ccgaaccggt	gacgggtgctg	120
tggaactcag	gcgccctgac	cagcggcgtg	cacaccttcc	cggtgtcct	acagtccctca	180
ggactctact	ccctcagcag	cgtggtgacc	gtgccctcca	gcagcttggg	caccagacc	240
tacatctgca	acgtgaatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagaa	agttgagccc	300
aaatcttgty	acaaaactca	cacatgcccc	ccgtgccag	cacctgaact	cctgggggga	360
ccgtcagtct	tcctcttccc	cccaaaacc	aaggacacc	tcattgatctc	ccggaccct	420
gagtcacat	gcgtgggtgt	ggacgtgagc	cacgaagacc	ctgagggtcaa	gttcaactgg	480
tacgtggacg	gcgtggaggt	gcataatgcc	aagacaaagc	cgcgaggagga	gcagtacaac	540
agcacgtacc	gtgtgggtcag	cgtcctcacc	gtcctgcacc	aggactggct	gaatggcaag	600
gagtacaagt	gcaaggtctc	caacaaagcc	ctcccagccc	ccatcgagaa	aaccatctcc	660
aaagccaaag	ggcagccccg	agaaccacag	gtgtacacc	tgccccatc	ccgggatgag	720
ctgaccaaga	accaggtcag	cctgacctgc	ctggtcaaag	gcttctatcc	cagcgacatc	780
gccgtggagt	gggagagcaa	tgggcagccg	gagaacaact	acaagaccac	gcctcccgtg	840
ctggactccg	acggctcctt	cttcctctat	agcaagctca	ccgtggacaa	gagcaggtgg	900
cagcagggga	acgtcttctc	atgctccgtg	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	960
cagaagagcc	tctccctgtc	tccgggtaaa				990

FIG. 1B

ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSKV	HTFPAVLQSS	60
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNPKPS	NTKVDKKEVP	KSCDKHTHTCP	PCPAPPELLGG	120
PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCTVVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREBQYN	180
STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSRDE	240
LTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTPPV	LDSGDGFPLY	SKLTVDKSRW	300
QQGNVFSQSV	MHEALFNHYT	QKSLSLSPGK				330

FIG. 2A

Región Constante de la Cadena Kappa

cgaactgtgg	ctgcaccatc	tgtcttcac	ttccegcat	ctgatgagca	gttgaatct	60
ggaactgcct	ctggtgtgtg	cctgctgaat	aacttctatc	ccagagaggc	caaagtacag	120
tggaagggtg	ataacgccct	ccaatcgggt	aactcccagg	agagtgtcac	agagcaggac	180
agcaaggaca	gcacctacag	cctcagcagc	accctgacgc	tgagcaaagc	agactacgag	240
aaacacaaag	tctacgcctg	cgaagtcacc	catcagggcc	tgagctcgcc	cgtcacaaag	300
agcttcaaca	ggggagagtg	t				321

FIG. 2B

RTVAAPSVFI	FPPSDEQLKS	GTASVVCLLN	NFYPREAKVQ	WKVDNALQSG	NSQESVTEQD	60
SKDSTYSLSS	TLTLKADYE	KHKVYACEVT	HQGLSSPVTK	SFNRGEC		107

FIG. 3A

Región Constante de IgG2 de la Cadena Pesada

gcctccacca	agggcccatc	ggtcttcccc	ctggcgccct	gctccaggag	cacctccgag	60
agcacagcgg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggt	gacgggtgctg	120
tggaactcag	gcgctctgac	cagcggcgtg	cacaccttcc	cagctgtcct	acagtccctca	180
ggactctact	ccctcagcag	cgtggtgacc	gtgccctcca	gcaacttcgg	cacccagacc	240
tacacctgca	acgtagatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagac	agttgagcgc	300
aaatgttgtg	tcgagtgccc	accgtgcccc	gcaccacctg	tggcaggacc	gtcagtcttc	360
ctcttcccc	caaaacccaa	ggacaccctc	atgatctccc	ggaccctga	ggtcacgtgc	420
gtggtggtgg	acgtgagcca	cgaagacccc	gaggtccagt	tcaactggta	cgtggacggc	480
gtggaggtgc	ataatgccaa	gacaaagcca	cgaggaggagc	agttcaacag	cacgttccgt	540
gtggtcagcg	tcctcaccgt	tgtgcaccag	gactggctga	acggcaagga	gtacaagtgc	600
aaggctctcca	acaaaggcct	cccagccccc	atcgagaaaa	ccatctccaa	aaccaaaggg	660
cagccccgag	aaccacaggt	gtacaccctg	cccccatccc	gggaggagat	gaccaagaac	720
caggtcagcc	tgacctgcct	ggtcaaaggc	ttctacccca	gcgacatcgc	cgtggagtgg	780
gagagcaatg	ggcagccgga	gaacaactac	aagaccacac	ctcccatgct	ggactccgac	840
ggctccttct	tcctctacag	caagctcacc	gtggacaaga	gcaggtggca	gcaggggaac	900
gtcttctcat	gctccgtgat	gcatgaggct	ctgcacaacc	actacacgca	gaagagcctc	960
tcctgtcttc	cgggtaaa					978

FIG. 3B

ASTKGPSVFP	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSKV	HTFPAVLQSS	60
GLYSLSSVVT	VPSSNFGTQT	YTCNVDPKPS	NTKVDKTVR	KCCVCPPCP	APPVAGPSVF	120
LFPPKPKDTL	MISRTPEVTC	VVDVSHEDP	EVQFNWYVDG	VEVHNAKTKP	REEQFNSTFR	180
VVSVLTVVHQ	DWLNGKEYKC	KVSNKGLPAP	IEKTIKTKG	QPREPQVYTL	PPSREBMTKN	240
QVSLTCLVKG	FYPSDIAVEW	ESNGQPENNY	KTTTPMLDSD	GSFPLYSKLT	VDKSRWQQGN	300
VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL	SLSPGK				326

FIG. 4A

Región Constante de IgG4 de la Cadena Pesada

gccagcacca	aggggccatc	cgtcttcccc	ctggcgccct	gctccaggag	cacctccgag	60
agcacagecg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggt	gacgggtgctg	120
tggaactcag	gcgcccctgac	cagcggcgctg	cacaccttcc	cggctgtcct	acagtectca	180
ggactctact	ccctcagcag	cgtggtgacc	gtgccctcca	gcagcttggg	cacgaagacc	240
tacacctgca	acgtagatca	caagcccage	aacaccaagg	tggacaagag	agttgagctc	300
aaatatggtc	ccccatgccc	atcatgccc	gcacctgagt	tcctgggggg	accatcagtc	360
ttcctggtcc	ccccaaaacc	caaggacact	ctcatgatct	cccggacccc	tgaggtcacg	420
tgcgtgggtg	tggacgtgag	ccaggaagac	cccgaggtcc	agttcaactg	gtacgtggat	480
ggcgtggagg	tgcataatgc	caagacaaag	ccgcgggagg	agcagttcaa	cagcacgtac	540
cgtgtggtca	gcgtcctcac	cgtcctgcac	caggactggc	tgaacggcaa	ggagtacaag	600
tgcaaggtet	ccaacaaagg	cctcccgtcc	tccatcgaga	aaacctctc	caaagccaaa	660
gggcagcccc	gagagccaca	ggtgtacacc	ctgcccccat	cccaggagga	gatgaccaag	720
aaccaggtca	gcctgacctg	cctgggtcaaa	ggcttctacc	ccagcgacat	cgccgtggag	780
tgggagagca	atgggcagcc	ggagaacaac	tacaagacca	cgctcccgt	gctggactcc	840
gacggctcct	tcttctctca	cagcaggcta	accgtgraca	agagcagggtg	gcaggagggg	900
aatgtcttct	catgctccgt	gakgcatgag	gctctgcaca	accactacac	acagaagagc	960
ctctccctgt	ctctgggtaa	a				981

FIG. 4B

ASTKGPSVFP	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	60
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTKT	YTCNVDHKPS	NTKVDKRVES	KYGPPCPSCP	APEFEGGPSV	120
FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSQED	PEVQFNWYVD	GVEVHNAKTK	PREEQFNSTY	180
RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKGLPS	SIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSQEEMTK	240
NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPVLDL	DGSFFLYSRL	TVDKSRWQEG	300
NVFSCSVMEH	ALHNHYTQKS	LSLSLGK				327

FIG. 5A

Cadena Pesada de 26F5

atggagttg	ggctgagctg	ggtcttctc	gttgctctt	taagaggtgt	ccagtgtcag	60
gtgcagctgg	tggagtctgg	gggaggcgtg	gtccagcctg	ggaggtccct	gagactctcc	120
tgtgcagcgt	ctggattcac	cttcagcaac	tatggcatgc	actgggtccg	ccaggctcca	180
ggcaaggggc	tggagtgggt	ggcaggcatt	tggaatgatg	gaattaataa	ataccatgca	240
cactccgtga	ggggccgatt	caccatctcc	agagacaatt	ccaagaacac	gctgtatctg	300
caaatgaaca	gcccgagagc	cgaggacacg	gctgtgtatt	actgtgcgag	agcacggtct	360
ttcgactggc	tattatttga	gttctggggc	cagggaaacc	tggtcacctg	ctctagt	417

FIG. 5B

MEFGLSWVFL	VALLRGVQCQ	VQLVESGGGV	VQGRSLRLS	CAAGFTFSN	YGMHWVRQAP	60
GKGLEWVAGI	WNDGINKYHA	HSVRGRFTIS	RDNSKNTLYL	QMNSPRAEDT	AVYYCARARS	120
FDWLLPEFWG	QGLVTVSS					139

FIG. 6A

Cadena Kappa de 26F5

atggaagccc	cagctcagct	tctcttcctc	ctgctactct	ggctcccaga	taccaccgga	60
gaaattgtgt	tgacacagtc	tccagccacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	120
ctctcctgca	gggccagtca	gagtgttagc	agctacttag	cctggtacca	acagaaacct	180
ggccaggctc	ccaggctcct	catctatgat	gcatccaaca	gggccactgg	catcccagcc	240
aggttcagtg	gcagtgggtc	tgggacagac	ttcactctca	ccatcagcag	cctagagcct	300
gaagatthtg	cagthttatta	ctgtcagcag	cgtagcaact	ggcctccgct	cactttcggc	360
ggagggacca	aggthggagat	caaa				384

FIG. 6B

MEAPAQLLEFL	LLLWLPDTTG	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SYLAWYQQKP	60
GQAPRLLIYD	ASNRATGIPA	RFSGSGSGTD	FTLTSSLEP	EDFAVYICQQ	RSNWPPLTFG	120
GGTKVEIK						128

FIG. 7A

Cadena Pesada de 27F2

atggagttg	ggctgagctg	ggttttcctc	gttgctcttt	taagaggtgt	ccagtgtcag	60
gtgcagctgg	tggagtctgg	gggaggcgtg	gtccagcctg	ggaggtcctt	gagactctcc	120
tgtgcagtgt	ctggattcac	cttcagtaac	tatggcatgc	actgggtccg	ccaggctcca	180
ggcaaggggc	tggagtgggt	ggcagctata	tggaatgatg	gagaaaataa	acaccatgca	240
ggctccgtga	ggggccgatt	caccatctcc	agagacaatt	ccaagaacac	gctgtatctg	300
caaatgaaca	gcctgagagc	cgaggacacg	gctgtgtatt	actgtgcgag	aggacgatat	360
tttgactggt	tattatttga	gtattggggc	caggaaccc	tggtcacctg	ctctagt	417

FIG. 7B

MEFGLSWVFL	VALLRGVQCQ	VQLVESGGGV	VQPGRSLRLS	CAVSGFTFSN	YGMHWVRQAP	60
GKGLEWVAAI	WNDGENKHHA	GSVRGRFTIS	RDNSKNTLYL	QMNSLRABDT	AVYYCARGRY	120
FDWLLFEYWG	QGTLVTVSS					139

FIG. 8A

Cadena Pesada de 15C4

atgggggtcaa	cgccatcct	cgccctcctc	ctggctgttc	tccaaggagt	ctgtgccgag	60
gtgcagctga	tgcagtctgg	agcagaggtg	aaaaagcccg	gggagtctct	gaagatctcc	120
tgtaagggtt	ctggatacag	cttttccttc	cactggatcg	cctgggtgcg	ccagatgccc	180
gggaaaggcc	tggagtggat	ggggatcatc	catcctggtg	cctctgatac	cagatacagc	240
ccgtccttcc	aaggccaggt	caccatctca	gccgacaact	ccaacagcgc	cacctacctg	300
cagtggagca	gcctgaaggc	ctcggacacc	gccatgtatt	tctgtgagag	aaaaggaa	360
ctcgactact	ttgactactg	gggccagggg	accctgggtc	ccgtctctag	t	411

FIG. 8B

MGSTAILALL	LAVLQGVCAE	VQLMQSGAEV	KKPGESLKIS	CKGSGYSFSF	HWIAWVRQMP	60
GKGLEWMGII	HPGASDTRYS	PSFQGQVTIS	ADNSNSATYL	QWSSLKASDT	AMYFCARQRE	120
LDYFDYWGQG	TLVTVSS					137

FIG. 9A

Cadena Kappa de 15C4

atgtcgccat	cacaactcat	tgggtttctg	ctgctctggg	ttccagcctc	caggggtgaa	60
attgtgctga	ctcagttccc	agactttcag	tctgtgactc	caaaggagaa	agtcaccatc	120
acctgccggg	ccagtcagag	cattggtagt	agcttacct	ggtaccagca	gaaaccagat	180
cagtctcaa	agtcctcat	caagtatgct	tcccagtcct	tctcaggggt	cccctcgagg	240
ttcagtggca	gtggatctgg	gacagatttc	accctcacca	tcaatagcct	ggaagctgaa	300
gatgctgcag	cgtattactg	tcatcagagt	agtagtttac	ctctcacttt	cggcggaggg	360
accaaggtgg	agatcaaa					378

FIG. 9B

MSPSQLIGFL	LLWVPASRGE	IVLTQSPDFQ	SVTPKEKVTI	TCRASQSIGS	SLHWYQQKPD	60
QSPKLLIKYA	SQSFSGVPSR	FSGSGSGTDF	TLTINSLEAE	DAAAYYCHQS	SSLPLTFGGG	120
TKVEIK						126

FIG. 10

				CDR1		CDR2
26F5	QVQLVESGGG	VVQPGRSLRL	SCAASGFTFS	<u>NYGMHWVRQA</u>	PGKGLEWVAG	<u>IWNDGINKYH</u>
27F2	QVQLVESGGG	VVQPGRSLRL	SCAVSGFTFS	<u>NYGMHWVRQA</u>	PGKGLEWVAA	<u>IWNDGENKHH</u>
15C4	EVQLMQSGAE	VKKPGESLKI	SCKGSGYSFS	<u>FHWIAWVRQM</u>	PGKGLEWMI	<u>IHPGASDTRY</u>
						CDR3
26F5	<u>AHSVRGRFTI</u>	SRDNSKNTLY	LQMNSPRAED	TAVYCARAR	<u>SFDWLLFEFW</u>	GQGLVTVSS
27F2	<u>AGSVRGRFTI</u>	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYCARGR	<u>YFDWLLFEYW</u>	GQGLVTVSS
15C4	<u>SPSPQGQVTI</u>	SADNSNSATY	LQWSSLKASD	TAMYFCARQR	<u>ELDYFDYWGQ</u>	GTLVTVSS

FIG. 11

		CDR1			
26F5/27F2	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	<u>SYLAWYQQKP</u>	<u>GQAPRLLIYD</u>
15C4	EIVLTQSPDF	QSVTPKEKVT	<u>ITCRASQSIG</u>	<u>SSLHWYQKQ</u>	<u>DQSPKLLIKY</u>
		CDR2		CDR3	
26F5/27F2	<u>ASNRATGIPA</u>	RFSGSGSGTD	FTLTISSELP	<u>EDFAVYQCQ</u>	<u>RSNWPPLTFG</u>
15C4	<u>ASQSFSGVPS</u>	RFSGSGSGTD	FTLTINSLEA	<u>EDAAAYYCHQ</u>	<u>SSSLPLTFGG</u>
26F5/27F2	GGTKVEIK				
15C4	GTKVEIK				

FIG. 12

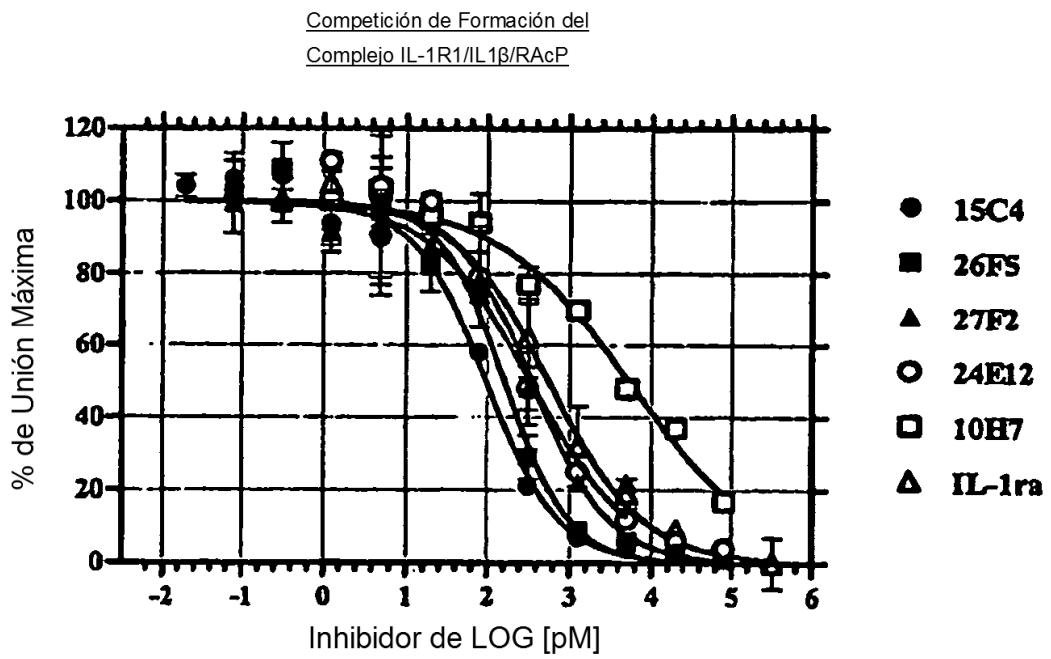


FIG. 13

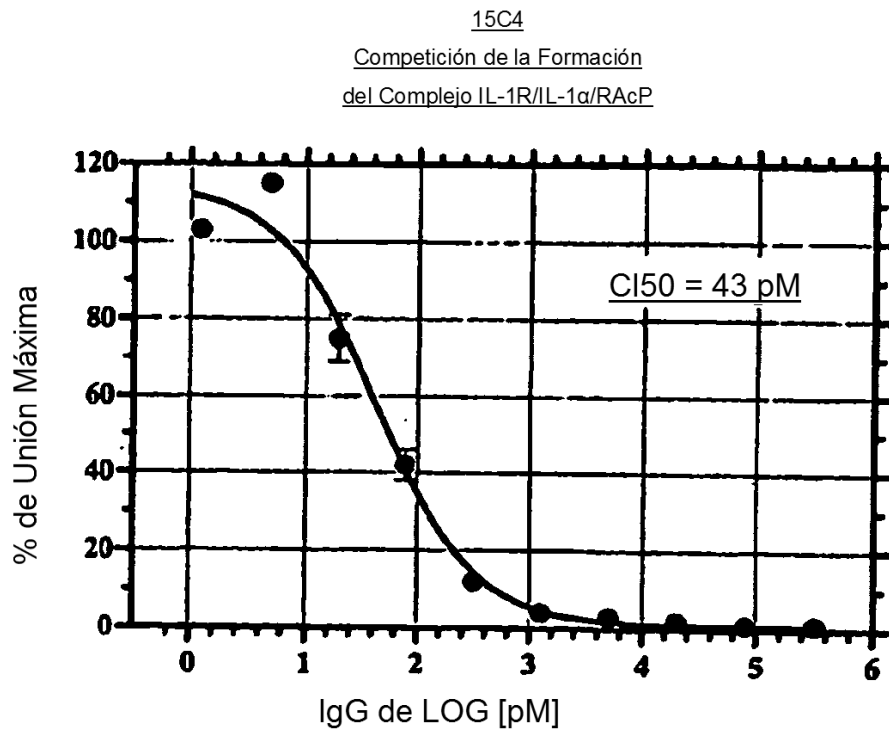


FIG. 14

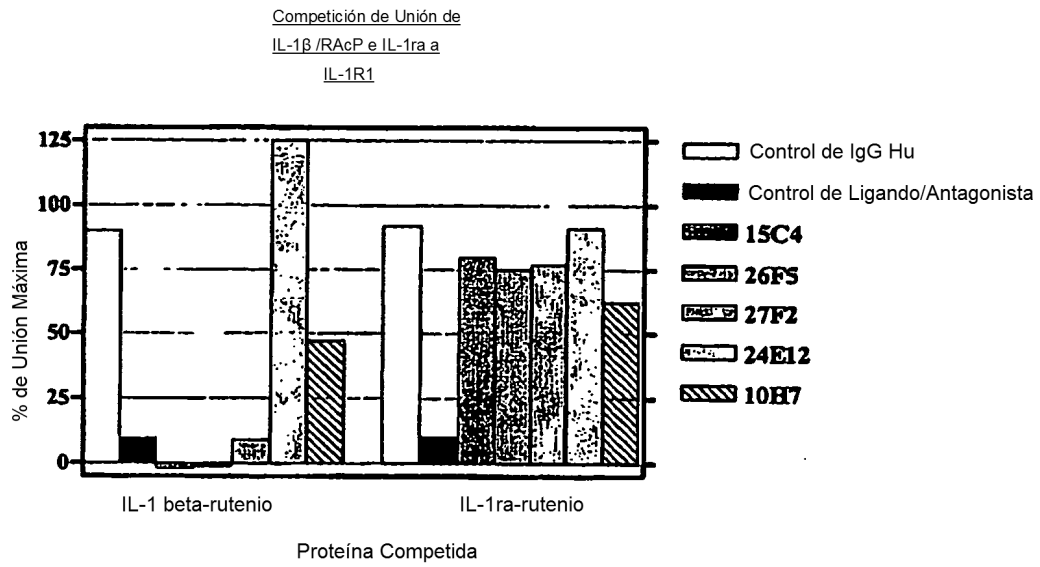


FIG. 15A

Inhibición de la Producción
de IL-6 Inducida por IL-1
en Condrocitos Humanos
Primarios

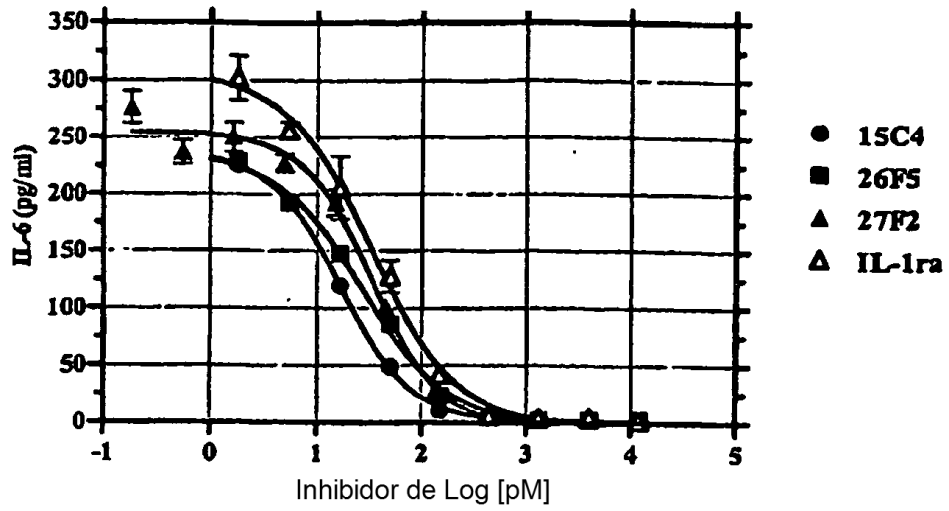


FIG. 15B

Inhibición de IL-6 Inducida por IL-1
en Condrocitos Humanos
Primarios

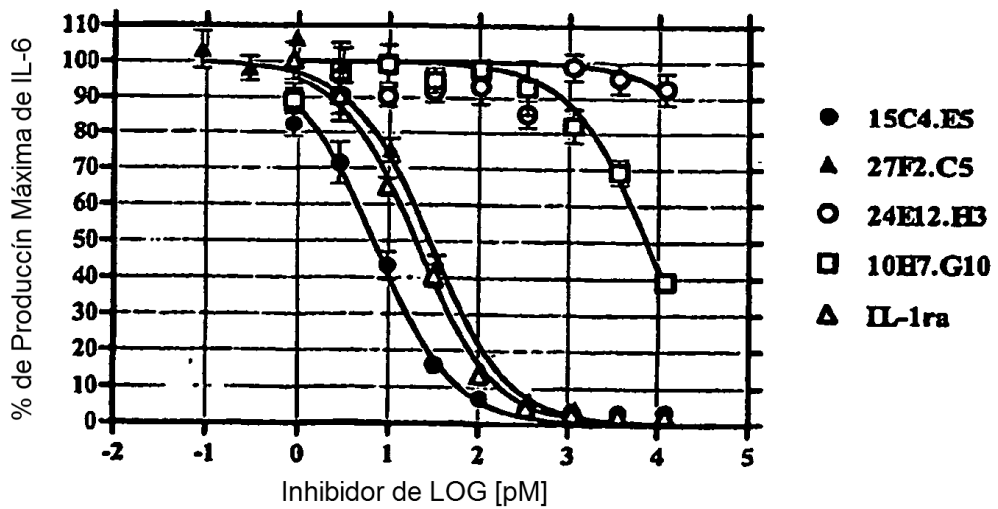


FIG. 16

Inhibición de la Producción de IL-6
Inducida por IL-1 en Sangre Entera
Humana (material compuesto)

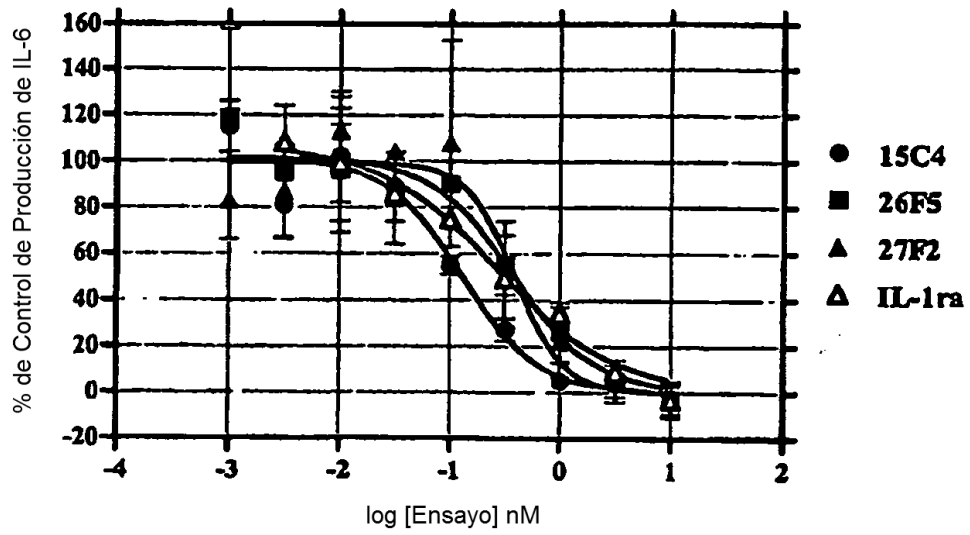


FIG. 17

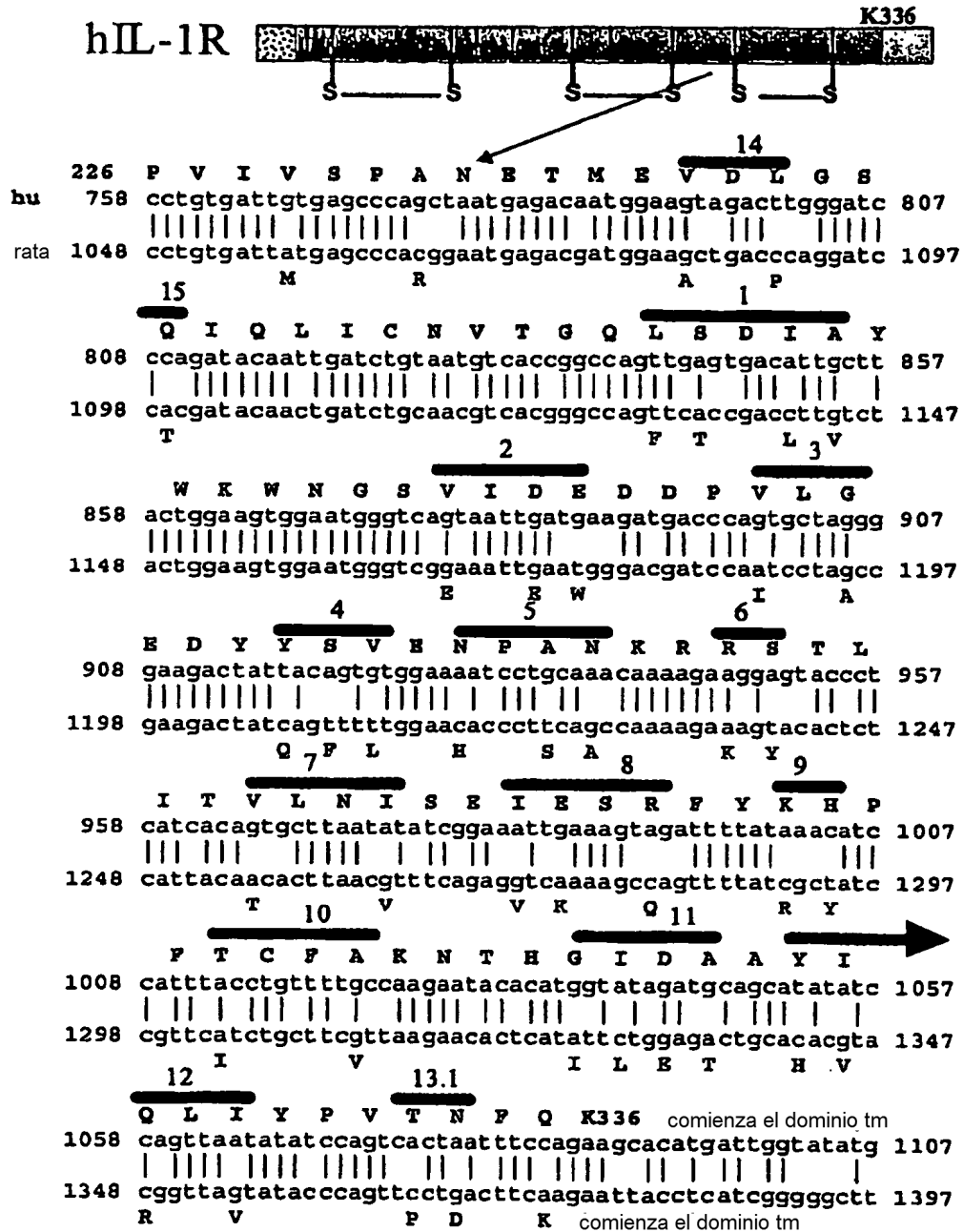


FIG. 18

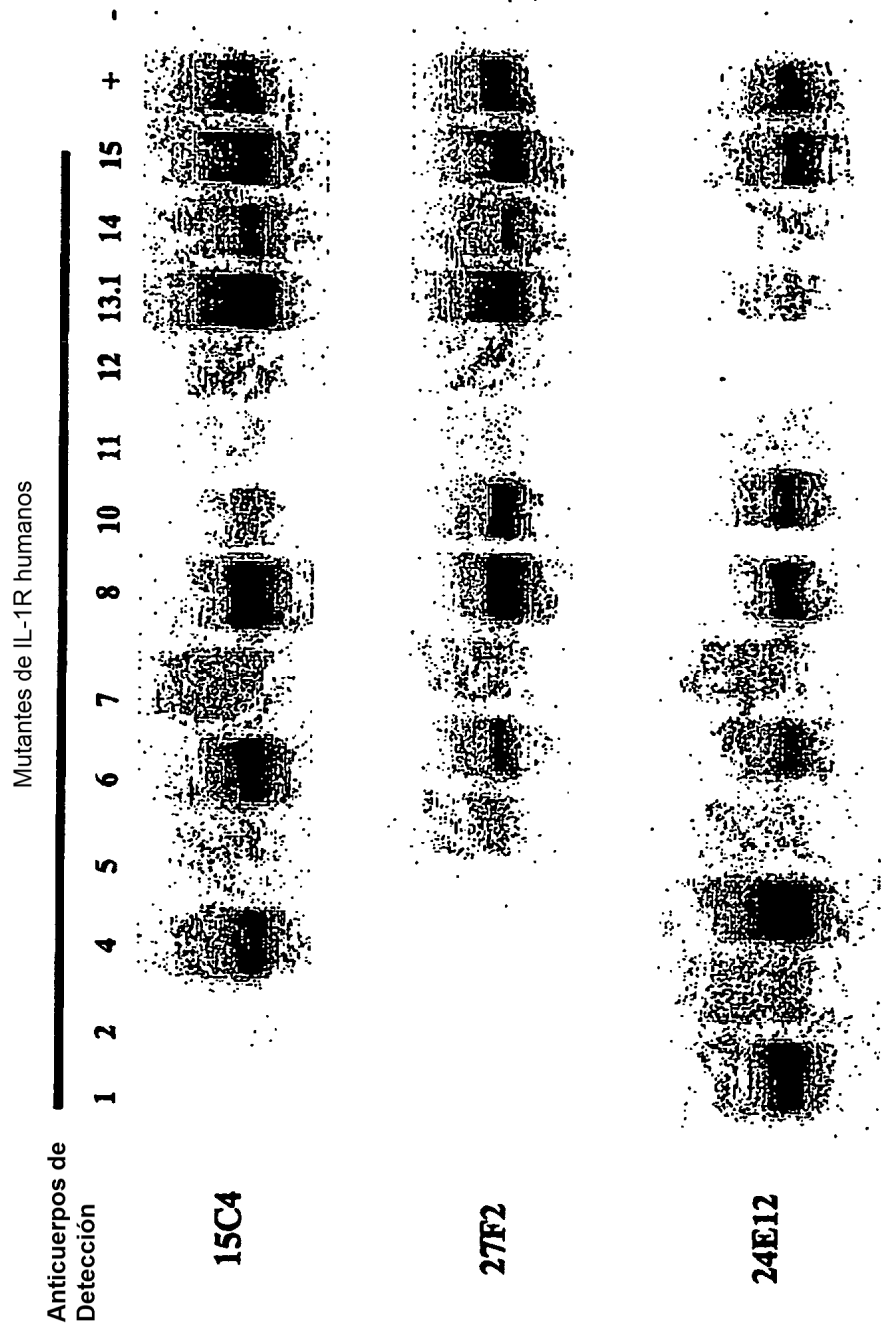


FIG. 19

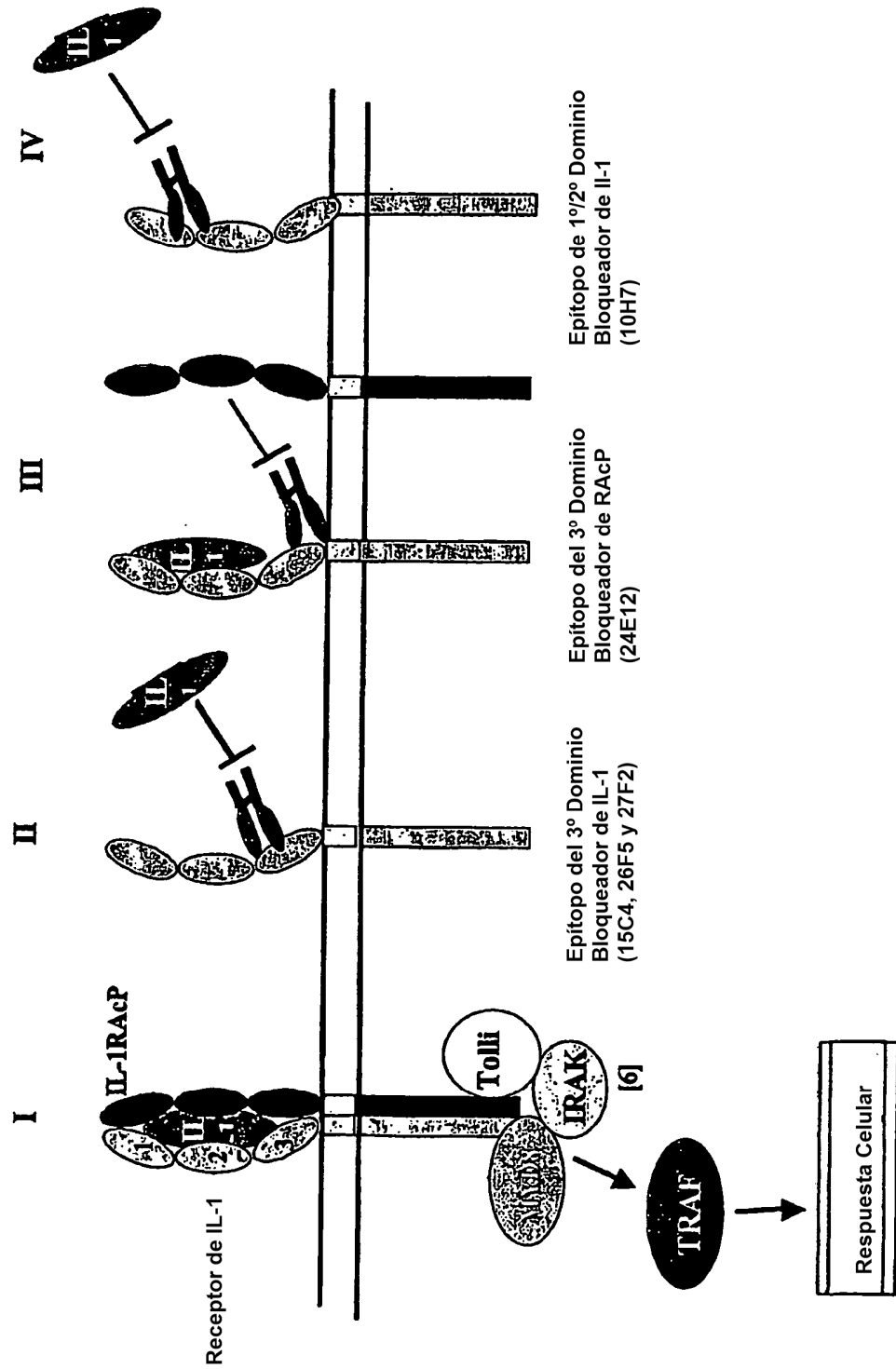


FIG. 20



FIG. 21

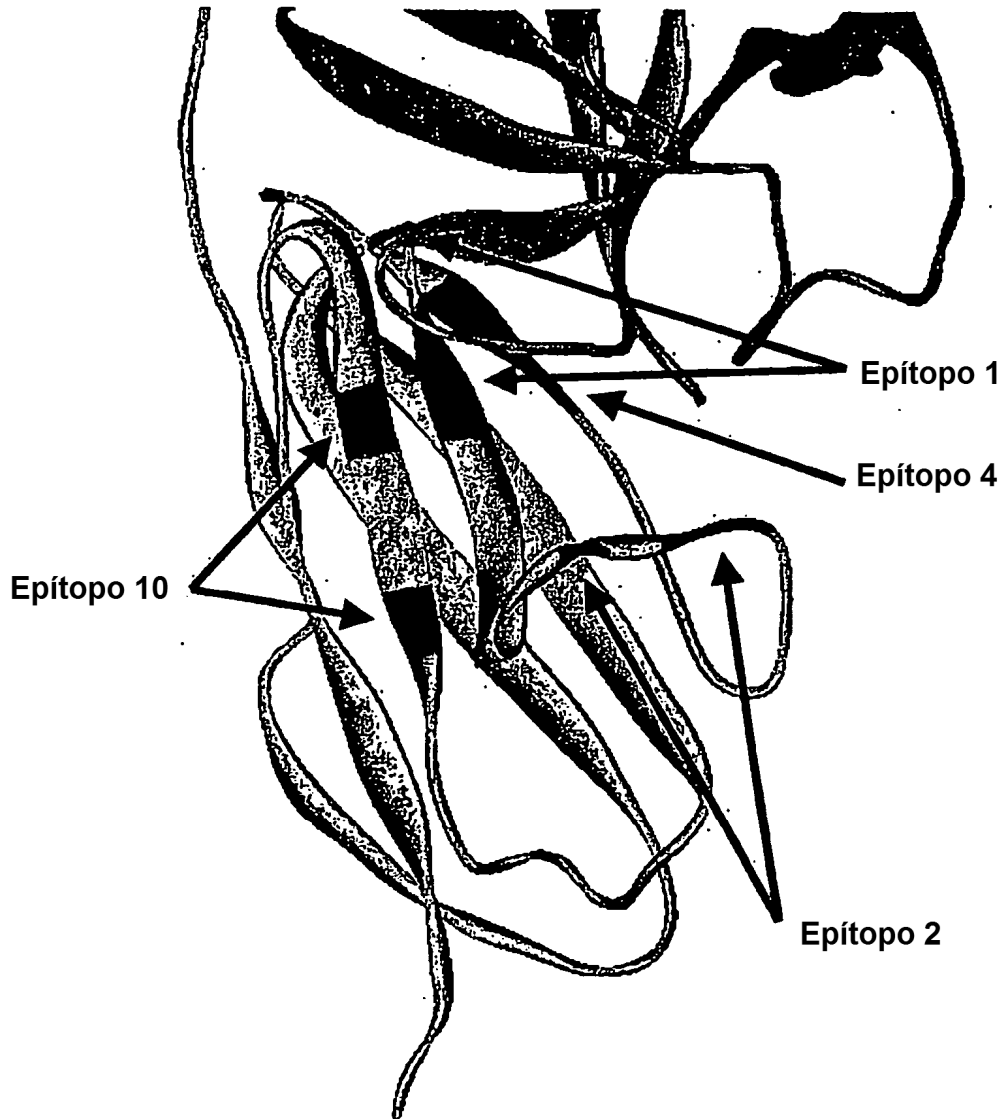


FIG. 22

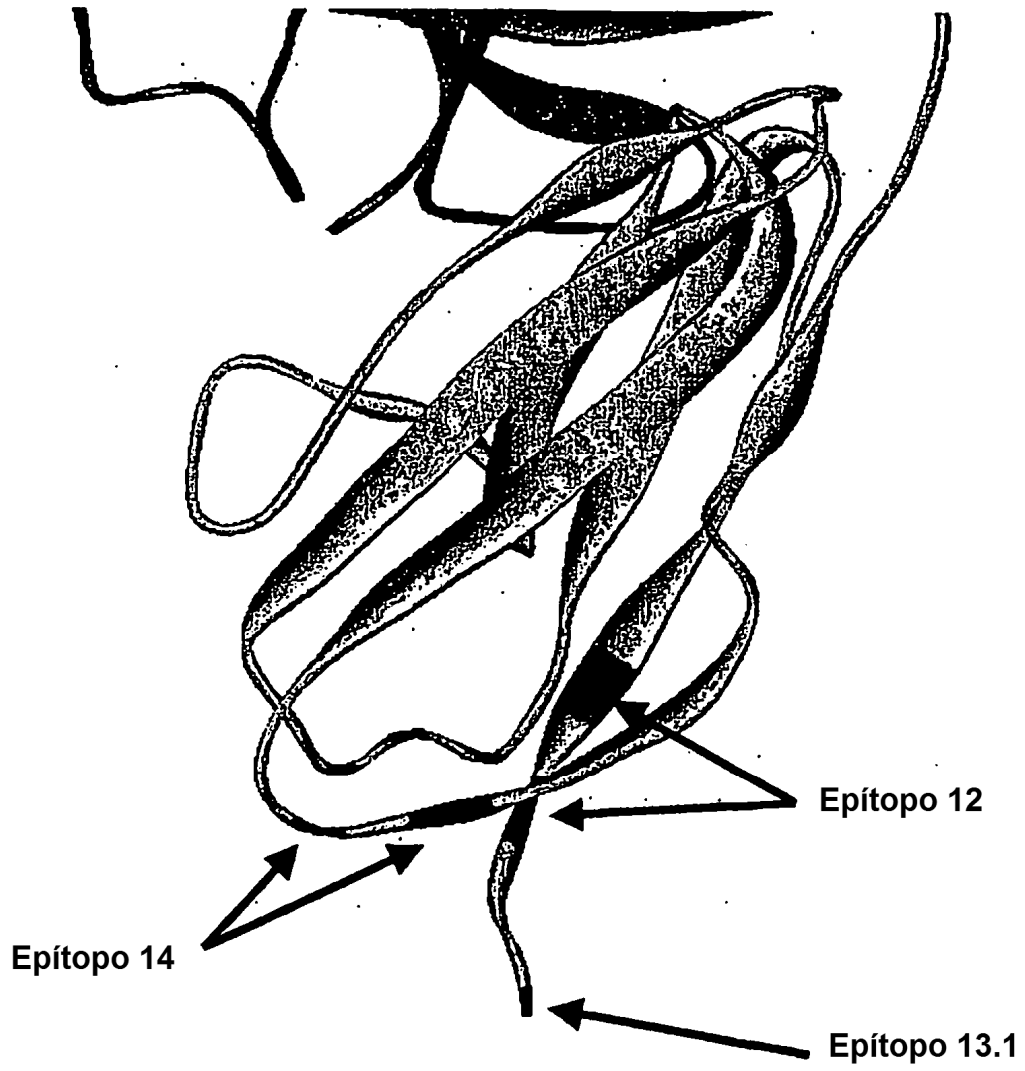


FIG. 23

MVHATSPILL	LLLLSLALVA	PGLSARKCSL	TGKWTNDLGS	NMTIGAVNSK	GEFTGTYTTA	60
VTATSNEIKE	SPLHGTONTI	NKRTQPTFGF	TVNWKPFSEST	TVFTGQCFID	ENGKEVLKTM	120
WLLRSSVNDI	GDDWKATRVG	INIFTRLRTQ	KEQLLASLLE	ADKCKEREK	IILVSSANEI	180
DVRPCPLNPN	EHKGTITWYK	DDSKTPVSTR	QASRIHQHKE	KLWFVPAMVE	DSGHYYCVVR	240
NSSYCLRIKI	SAKFVENEFPN	LCYNAQAIFK	QKLPVAGDGG	LVCPYMEFFK	NENNELPKLQ	300
WYKDCKPLL	DNIHFSGVKD	RLIVMVAEK	HRGNYTCHAS	YTYLGRQYPI	TRVIEPITLB	360
ENKPTRPVIV	SPANETMEVD	LGSQIQLICH	VTGQLSDIAY	WKWNGSVIDE	DDPVLGEDYY	420
SVENPANKRR	STLITVLNIS	EIESRFYKRP	FTCFAKNTHG	IDAAYIQLIY	PVTNFOKDYG	480
DDDDK						485

FIG. 24

1 MVHATSPLLL LLLLSLALVA PGLSARKCSL TGKWTNDLGS NMTIGAVNSK GEFTGTYTTA
 61 VTATSNEIKE SPLHGTQNTI NKRTQPTFGF TVNWKFSST TVFTGQCFID RNGKEVLKTM
 121 WLLRSSVNDI GDDWKATRVG INIFTRLRTO KEQLLASLLE ADKCNEREEK IILVSSANEI
 181 DVRPCPLNPN EYKGTITWYK NDSKTPISTE QASRIHQHK KLWFVPAKVE DSGHYCVVR
 241 NSSYCLRIKI TAKFVENEPN LCYNABAIK QRLPVAGDGG LVCPYMEFFK DENNELPKLL
 301 WYKDCKPLLL DNIHFSGVKD RLIVMNVAEK HRGNYTCHAS YTYLGKQYPI TRVIEFITLE

mutación 1 mutación 2



361 ENKPTRPVIV SPANETIEVD LGSQIQLICN VTGQLSDTAY WKWNGSFIDE DDPVLGEDYY
humana

mutación 10.1 mutación 10.2



421 SVENPANKRR STLITVLNIS ETBSRFYKHP FTCLARNTHG MDAAYVQLIY PVTKFQKDYK
humana

F K

481 DDDDK

FIG. 25A

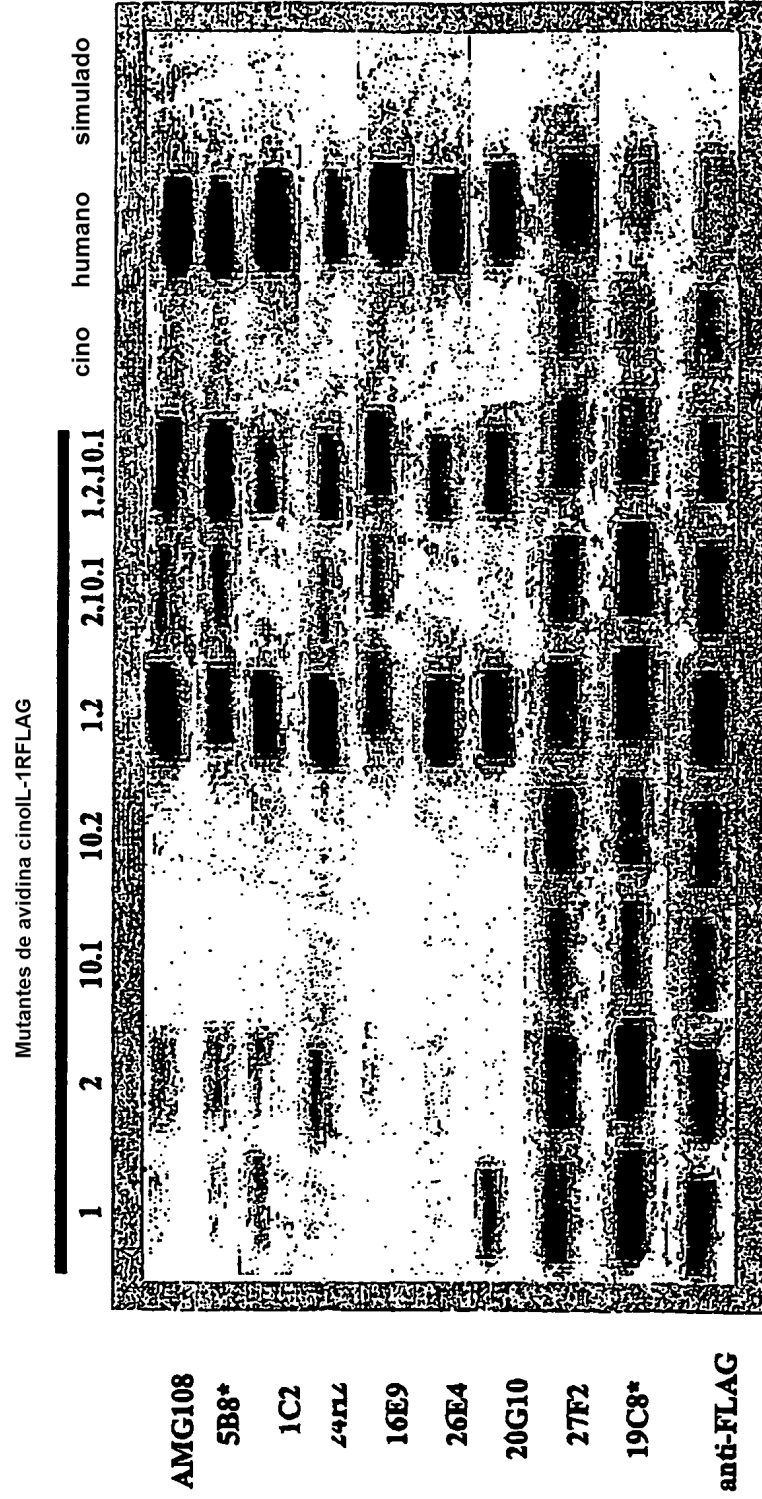
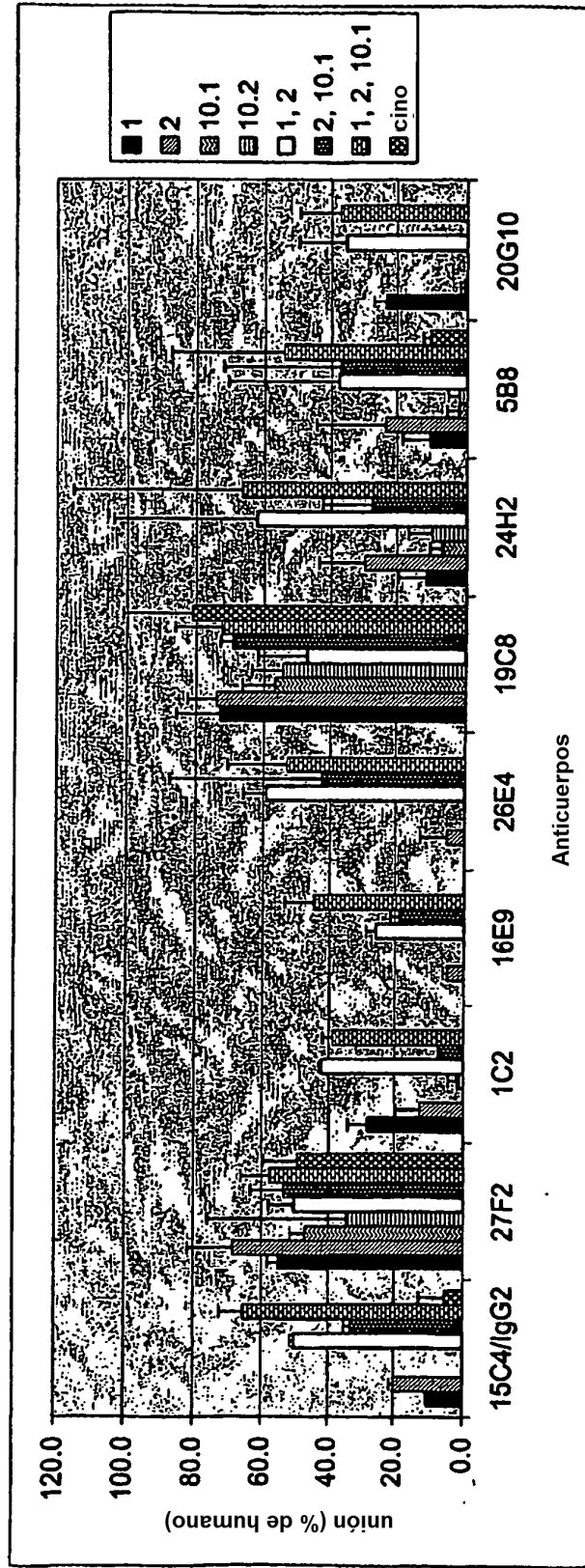


FIG. 25B



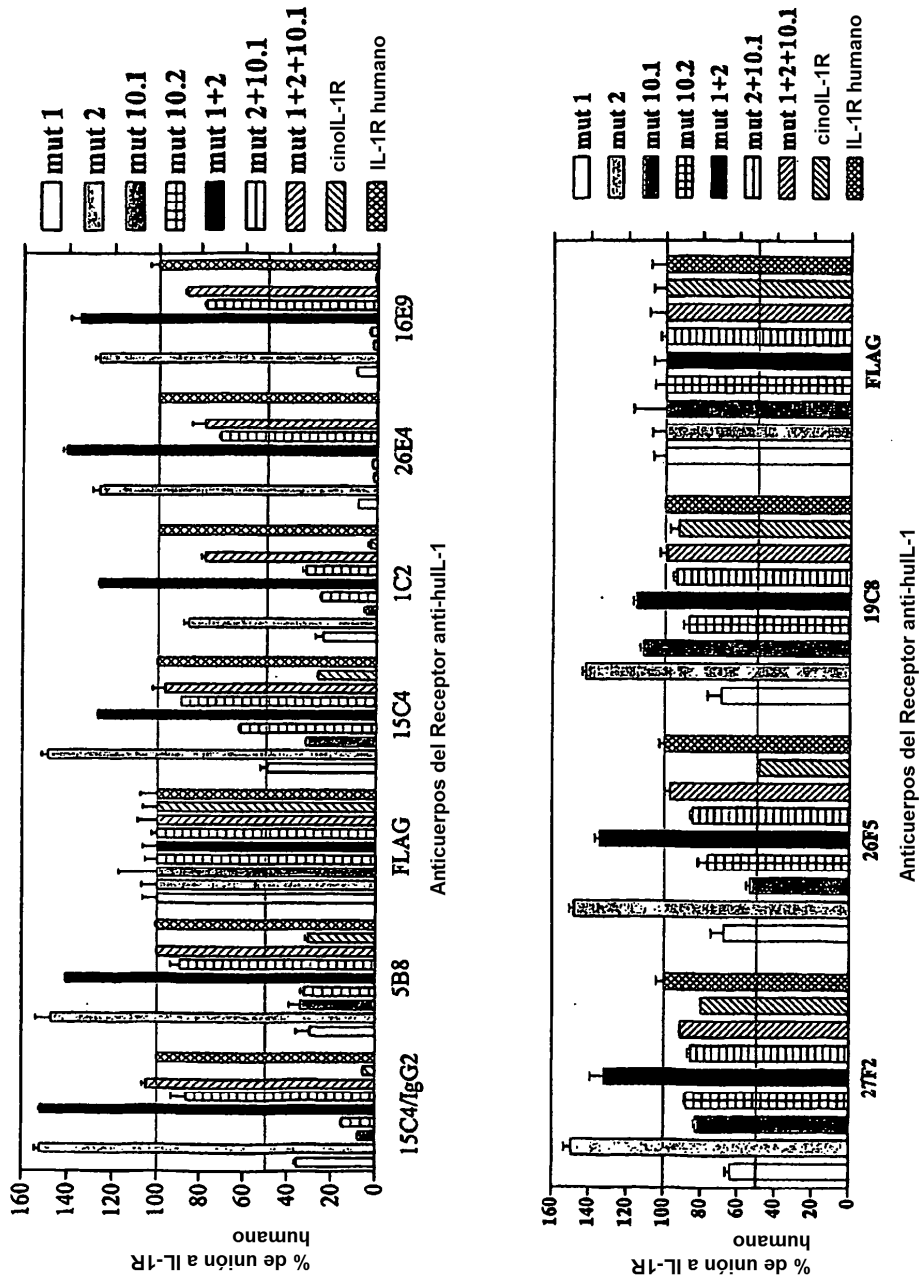


FIG. 26