

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 189**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2003 E 10010884 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2277543**

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

30 Prioridad:

06.09.2002 US 408719 P

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

01.04.2016

73 Titular/es:

**AMGEN, INC (50.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US y
E. R. SQUIBB & SONS, L.L.C. (50.0%)**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 565 189 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 reclama prioridad sobre el número de serie de solicitud provisional de EE.UU. 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 También se proporcionan composiciones, particularmente composiciones farmacéuticas y procedimientos para trata enfermedades mediadas por la IL-1, tales como artritis reumatoide, osteoartritis y otras afecciones inflamatorias.

Antecedentes de la invención

- 15 Desarrollo de anticuerpos
- 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 se producen cuando la inflamación se expresa de una manera exagerada, induce por un estímulo inapropiado o persiste después de la eliminación del agente lesivo.

- 20 La respuesta inflamatoria está mediada, entre otras, por las citocinas. Una de las citocinas inflamatorias más potentes descubierta es la interleucina 1 (IL-1). Un incremento de la señalización de la IL-1 produce inflamación persistente asociada con varias enfermedades y se piensa que la IL-1 es un mediador clave en muchas enfermedades y afecciones médicas. Esta citocina se fabrica principalmente (aunque no exclusivamente) en 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 interaccionando con un complejo de receptor heterodimérico compuesto por dos proteínas transmembrana, el receptor de IL-1 de tipo 1 (IL-1 R1) y la proteína accesoria del receptor de IL-1 (IL-1 RAcP). La IL-1 se une primero al IL- 1R1; después se recluta la RAcP de IL-1 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 transducción de señal que tiene como resultado la inducción de una respuesta celular.

- 35 Los estudios de unión basados en células sugieren que la RAcP de IL-1 estabiliza el complejo de señalización del 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 el IL-1R se ha caracterizado exhaustivamente, la interacción de RAcP de IL-1 con el receptor unido al ligando sigue sin estar bien definida. Dado que la RAcP de IL-1 no tiene una afinidad significativa por la IL-1 o el IL-1R1 por separado pero una elevada afinidad por el complejo, se deduce que el suceso de unión IL-1/IL-1R crea nuevos sitios de unión para RAcP de IL-1 que pueden incluso incluir contribuciones por residuos de IL-1 (Ettore et al., 1997, Eur. Cytokine Netw. 8:161-171). Otra molécula, el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra) compete con IL-1 α e IL-1 β por la unión al receptor, pero no recluta la RAcP de IL-1, lo que tiene como resultado un receptor ocupado pero que no señala. La actividad de la IL-1 puede además contrarrestarse mediante el 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. El IL-1 ra y el IL-1 R de tipo II actúan reduciendo la gravedad y la duración de los acontecimientos inflamatorios mediados por la 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 la interleucina 1 se pueden producir a partir de cualquier proteína capaz de prevenir específicamente la activación de los receptores celulares de la IL-1, que puede ser el resultado de una serie de mecanismos, Dichos mecanismos incluyen la regulación por disminución de la producción de IL-1, la unión de IL-1 libre, la interferencia con la unión de la IL-1 al IL-1R, la interferencia con la formación del complejo IL-1 R-IL-1 RAcP o la interferencia con la modulación de la señalización de la IL-1 tras la unión a su receptor. Las clases de inhibidores de IL-1 incluyen:

- Antagonistas del receptor de la interleucina 1, tales como IL-1ra, como se describe más adelante;
- Anticuerpos monoclonales anti-IL-1R (p. ej., como se divulga en la solicitud de patente europea publicada nº EP 623674, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia);
- Proteínas de unión a IL-1, tales como receptores solubles de IL-1 (p. ej., como se divulga en las patentes de EE.UU. nº 5,492,888; 5,488,032; 5,464,937; 5,319,071; y 5,180,812
- 65 • Anticuerpos monoclonales anti-IL-1 (p. ej., como se divulga en las publicaciones de solicitudes de patentes

internacionales n° WO 9501997, WO 9402627, WO 9006371, la patente de EE.UU. n.º 4.935.343, EP 364778, EP 267611 y EP 220063,

- Proteínas accesorias al receptor de la IL-1 y anticuerpos de las mismas (p. ej., como se divulga en las publicaciones de solicitudes de patente internacional n° WO 96/23067 y WO 99/37773; y
- Inhibidores de la enzima convertidora de la interleucina-1 β (ICE) o la caspasa (p. ej., como se divulga en las publicaciones de solicitudes de patente internacional n° WO 99/46248, WO 99/47545, y WO 99/47154, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia que se pueden usar para inhibir la producción y secreción de IL-1 β ;
- inhibidores de la interleucina-1 β proteasa; y
- otros compuestos y proteínas que bloquean la síntesis in vivo o la liberación extracelular de IL-1.

Ejemplos de inhibidores de la IL-1 se divulgan en las referencias siguientes: Las patentes de EE.UU. N° 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; las publicaciones de solicitud de patente internacional N° WO98/21957, WO96/09323, WO91/17184, WO96/40907, WO98/32733, WO98/42325, WO98/44940, WO98/47892, WO98/56377, WO99/03837, WO99/06426, WO99/06042, WO91/17249, WO98/32733, WO98/17661, WO97/08174, WO95/34326, WO99/36426, y WO99/36415; las publicaciones de solicitud de patente europea N° EP534978 y EP89479; y la solicitud de patente francesa n° FR 2762514. "Sims J. E. et al. divulga anticuerpos conocidos contra los receptores de tipo I y de tipo II de la interleucina 1 (IL-1) y concluye que el receptor de tipo I (IL-1R1) es responsable de mediar en la transducción de señal tras la unión a la IL-1".

El antagonista del receptor de la interleucina 1 (IL-1ra) es una proteína humana que actúa como inhibidor natural de la interleucina 1 y es un miembro de la familia de la IL-1, que incluye IL-1 α e IL-1 β . Antagonistas preferidos del receptor (incluidos IL-1 ra y variantes y derivados de los mismos), así como procedimientos de fabricarlos y usarlos, se describen en la patente de EE.UU. n° 5,075,222; las publicaciones de solicitud de patente internacional N° WO 91/08285; WO 91/17184; WO92/16221; WO93/21946; 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° AU9173636; y la solicitud de patente francesa n° FR2706772; Las proteínas incluyen formas glicosiladas así como no glicosiladas de los antagonistas de receptor de la IL-1.

Específicamente se divulgan tres formas útiles del IL-1 ra y variantes del mismo y se describen en la patente de EE.UU. n° 5,075,222 ("la 'patente 222"). El IL-1 ra α se ha caracterizado 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. El IL-1 ra β se ha caracterizado como una proteína de 22-23 kD que eluye en una columna Mono Q en NaCl 48 mM. Tanto el IL-1 ra α como el IL-1 ra β están glicosilados. El IL-1 ra se ha caracterizado 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 procedimientos 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, el IL-1ra tiene una semivida relativamente corta. En el uso actual, el IL-1 ra se administra una vez al día. Por tanto, la técnica se beneficiaría de un antagonista del receptor de IL-2 con una semivida apreciablemente más larga.

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

Sumario de la invención

La invención proporciona las siguientes realizaciones como se define en los siguientes puntos 1-11:

1. Un anticuerpo humano aislado que se une específicamente al tercer dominio (SEQ ID NO: 76) del receptor de tipo 1 de la interleucina 1 (IL-1R1) e inhibe la unión a IL-1B, pero no significativamente a IL-1ra, donde el anticuerpo se une específicamente a un epítipo conformacional en el tercer dominio de IL-1R1, donde el epítipo conformacional comprende la secuencia de aminoácidos YSV.
2. El anticuerpo del punto 1, que es un anticuerpo Fv de una sola cadena.
3. El anticuerpo de los puntos 1 o 2, que es un anticuerpo Fab, Fab', o (Fab')₂.

4. El anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3, donde el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano.

5. El anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 4, que es un anticuerpo IgG2.

6. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de una cualquiera de los puntos 1 a 5.

7. Un anticuerpo humano aislado que se une específicamente al tercer dominio (SEQ ID NO: 76) del receptor de tipo 1 de la interleucina 1 (IL-1R1) para su uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por IL-1 en un paciente, donde la enfermedad mediada por IL-1 se selecciona de enfermedad pulmonar obstructiva crónica o EPOC, proteinosis 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 de dificultad respiratoria aguda o SDRA, displasia broncopulmonar displasia o DBP, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas seleccionadas de enfisema y bronquitis crónica, enfermedad pulmonar fibrótica crónica, asbestosis, neumoconiosis de los mineros del carbón, silicosis, neumonía organizada bronquioliterante, sarcoidosis pulmonar, rinitis alérgica, dermatitis de contacto, dermatitis atópica, diabetes, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide, y asma; donde el anticuerpo se une específicamente a un epítipo conformacional en el tercer dominio de IL-1R1, y donde el epítipo conformacional comprende la secuencia de aminoácidos YSV, y donde el anticuerpo inhibe la señalización de la IL-1 al competir con IL-1 β por la unión a IL-1R1.

8. El anticuerpo para su uso de acuerdo con el punto 7, que es un anticuerpo Fv de una sola cadena.

9. El anticuerpo para su uso de acuerdo con los puntos 7 o 8, que es un anticuerpo Fab, Fab', o (Fab')₂.

10. El anticuerpo para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 7 a 9, donde el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano.

11. El anticuerpo para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 7 a 10, que es un anticuerpo IgG2.

En el presente documento se divulgan anticuerpos monoclonales que se unen al receptor de interleucina -1 de tipo I (IL-1 R1) como se define en las reivindicaciones adjuntas. Preferentemente, los anticuerpos inhiben la señalización de la IL-1 compitiendo con la unión de IL-1 β y de IL-1 α al IL-1R1. La presente invención también proporciona líneas celulares de hibridoma que producen, y más preferentemente, secretan en el medio de cultivo celular los anticuerpos monoclonales de la invención. Los anticuerpos de la invención bloquean con éxito la señalización de la IL-1 en células humanas y, de este modo, son útiles en el tratamiento de pacientes con enfermedades mediadas por la IL-1. La divulgación proporciona adicionalmente 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, la SEQ ID NO 12, la SEQ ID NO 14, la SEQ ID NO 16, la SEQ ID NO 18, la SEQ ID NO 20, la SEQ ID NO 22, la SEQ ID NO 24, la SEQ ID NO 26, la SEQ ID NO 28, la SEQ ID NO 30, la SEQ ID NO 32, la SEQ ID NO 34, la SEQ ID NO 36, la SEQ ID NO 38 y la SEQ ID NO: 40. Dichas moléculas se pueden preparar usando procedimientos como se describe en, por ejemplo, el documento WO 00/24782. Dichas moléculas se pueden expresar en, por ejemplo, células de mamífero (p. ej., células de ovario de hámster chino) o células bacterianas (p. ej., células de *E. coli*).

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

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

En ciertos aspectos, los anticuerpos comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, donde la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se indica en cualquiera de las SEQ ID NO 10, la SEQ ID NO 14 o la SEQ ID NO 16, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de los mismos. En otros aspectos, la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID NO 12 o la SEQ ID NO 18, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de los mismos. En aspectos adicionales, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO 20, la SEQ ID NO 22, la SEQ ID NO 24, la SEQ ID NO 26, la SEQ ID NO 28, la SEQ ID NO 30, la SEQ ID NO 32, la SEQ ID NO 34 o la SEQ ID NO 36, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de los mismos. En otros aspectos adicionales, la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos

5 tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO 38 o la SEQ ID NO 40, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de los mismos. Dichas cadenas de anticuerpos son útiles en la preparación de anticuerpos que se unen específicamente a IL-1 R1 y también en la preparación de anticuerpos biespecíficos donde la molécula resultante se une a IL-1 R1 y/o a otra molécula diana (p. ej., TNF o un receptor del TNF).

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

15 En ciertos aspectos, la divulgación también se refiere a anticuerpos que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena pesada comprende una primera región variable y donde la primera región variable comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos 90 %, más preferentemente de al menos 95 % y más preferentemente de aproximadamente 99 % con la secuencia de aminoácidos tal como se indica en la SEQ ID NO 10 y donde la cadena ligera comprende una segunda región variable y donde la segunda región variable comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos 90 %, más preferentemente de al menos 95 % y más preferentemente de aproximadamente 99 % con la secuencia de aminoácidos tal como se indica en la SEQ ID NO 20 12, donde el anticuerpo interacciona con IL-1 R1.

25 La divulgación se refiere a anticuerpos que se unen específicamente al IL-1 R1, de modo que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se indica en la SEQ ID NO 14, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de los mismos, y la cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO 12, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de los mismos.

30 En ciertos aspectos, la divulgación se refiere a anticuerpos que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena pesada comprende una primera región variable y donde la primera región variable comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos 90 %, más preferentemente de al menos 95 % y más preferentemente de aproximadamente 99 % con la secuencia de aminoácidos tal como se indica en la SEQ ID NO 35 14 y donde la cadena ligera comprende una segunda región variable y donde la segunda región variable comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos 90 %, más preferentemente de al menos 95 % y más preferentemente de aproximadamente 99 % con la secuencia de aminoácidos tal como se indica en la SEQ ID NO 12, donde el anticuerpo interacciona con IL-1 R1.

40 La divulgación se refiere a anticuerpos que se unen específicamente al IL-1 R1, donde la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se indica en la SEQ ID NO 16, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de los mismos, y la cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO 18, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de los mismos.

45 En ciertos aspectos, la divulgación se refiere a anticuerpos que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena pesada comprende una primera región variable y donde la primera región variable comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos 90 %, más preferentemente de al menos 95 % y más preferentemente de aproximadamente 99 % con la secuencia de aminoácidos tal como se indica en la SEQ ID NO 50 16 y donde la cadena ligera comprende una segunda región variable y donde la segunda región variable comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 90 %, más preferentemente de al menos 95 % y más preferentemente de aproximadamente 99 % con la secuencia de aminoácidos tal como se indica en la SEQ ID NO 18, donde el anticuerpo interacciona con IL-1 R1.

55 La divulgación se refiere a anticuerpos que se unen específicamente al IL-1 R1, donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se indica en la SEQ ID NO 20, la SEQ ID NO 22, la SEQ ID NO 24, la SEQ ID NO 26, la SEQ ID NO 28 o la SEQ ID NO 30, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de los mismos, y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO 38, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de los mismos.

60 La divulgación se refiere a anticuerpos que se unen específicamente al IL-1 R1, donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se indica en la SEQ ID NO 32, la SEQ ID NO 34 o la SEQ ID NO 36, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de los mismos, y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO 40, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de los mismos.

La divulgación se refiere a todos los anteriores que son anticuerpos de una sola cadena, anticuerpos Fv de una sola cadena, anticuerpos Fab, anticuerpos Fab' y anticuerpos (Fab')₂.

En aspectos concretos, la divulgación se refiere a una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO 38 o la SEQ ID NO 40, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de los mismos.

Además, la divulgación se refiere a una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO 20, la SEQ ID NO 22, la SEQ ID NO 24, la SEQ ID NO 26, la SEQ ID NO 28, la SEQ ID NO 30, la SEQ ID NO 32, la SEQ ID NO 34 o la SEQ ID NO 36, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de los mismos.

La divulgación también se refiere a anticuerpos humanos aislados que se unen específicamente al IL-1R1, donde el anticuerpo comprende: (a) regiones armazón de la cadena pesada humana, una región CDR1 de cadena pesada humana, una región CDR2 de cadena pesada humana y una región CDR3 de cadena pesada humana; y (b) regiones armazón de la cadena ligera humana, una región CDR1 de cadena ligera humana, una región CDR2 de cadena ligera humana y una región CDR3 de cadena ligera humana. En ciertos aspectos, la región CDR1 de la cadena pesada humana puede ser la región CDR1 de la cadena pesada de 26F5, 27F2 o 15C4, 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, 27F2, o 15C4 como se muestra en la Figura 11. En otros aspectos, la región CDR2 de la cadena ligera humana puede ser la región CDR2 de la cadena ligera humana de 26F5, 27F2 o 15C4 como se muestra en la Figura 11. En otros aspectos más, la región CDR3 de la cadena pesada humana puede ser la región CDR3 de la cadena pesada de 26F5, 27F2 o 15C4, 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, 27F2 o 15C4 como se muestra en la Figura 11.

Además, la divulgación se refiere a un anticuerpo humano aislado, como se define en las reivindicaciones, que se une específicamente al receptor de tipo 1 de la interleucina 1 (IL-1 R1), que comprende: una región CDR1 de la cadena pesada humana, 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; una región CDR2 de la cadena pesada humana, 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/o una región CDR3 de la cadena pesada humana, 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.

La invención también divulga un anticuerpo humano aislado, como se define en las reivindicaciones, que se une específicamente al receptor de tipo 1 de la interleucina 1 (IL-1 R1), que comprende: una región CDR1 de la cadena ligera humana, donde la CDR1 de la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 70 o SEQ ID NO 71; una región CDR2 de la cadena pesada humana, donde la CDR2 de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72 o SEQ ID NO: 73; y/o una región CDR3 de la cadena pesada humana, donde la CDR3 de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 74 o SEQ ID NO: 75.

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

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

Además, la invención proporciona un procedimiento para mapear el epítipo de un antígeno seleccionado. En un aspecto, el procedimiento comprende las etapas de: (a) generar un conjunto de proteínas de fusión, donde cada proteína de fusión comprende (i) avidina y (ii) un fragmento de antígeno; (b) detección selectiva del conjunto de proteínas de fusión para la unión a uno o más parejas de unión específicas 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 la pareja o parejas de unión específica para determinar los sitios de unión sobre el antígeno por la pareja o parejas de unión específica. En un aspecto concreto, las parejas de unión específica son anticuerpos.

En realizaciones adicionales, la invención proporciona su uso para tratar una enfermedad, afección o trastorno mediados por la IL-1, como se ha definido 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 inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional a un individuo que lo necesita,

La divulgación también proporciona procedimientos 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-1 R de la invención se pueden usar en cualquier

procedimiento de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitivos, ensayos de tipo sándwich directos e indirecto, ensayos de inmunoprecipitación y ensayos de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) (véase, Sola, 1987, Monoclonal Antibodies A Manual of Techniques, pág. 147-158, CRC Press, Inc.) para la detección y cuantificación de IL-1 R. Los anticuerpos se pueden unir a IL-1 R con una afinidad que es adecuada para el procedimiento de ensayo que se esté empleando.

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

10 Breve descripción de las figuras

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

Las Figuras 2A-2B representan una secuencia de ADNc (Fig. 2A) que codifica una región constante de la cadena kappa del anticuerpo anti-IL-1 R1 humano (SEQ ID NO 3) y la secuencia de aminoácidos (Fig. 2B) de una región constante de la cadena kappa del anticuerpo anti-IL-1 R1 humano (SEQ ID NO 4).

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-1 R1 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-1 R1 humano (SEQ ID NO 6).

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-1 R1 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-1 R1 humano (SEQ 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-1 R1 26F5 (SEQ ID NO 9) y la secuencia de aminoácidos (Fig. 5B) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-IL-1 R1 26F5 (SEQ ID NO 10).

Las Figuras 6A-6B representan una secuencia de ADNc (Fig. 6A) que codifica la región variable de la cadena kappa del anticuerpo anti-IL-1 R1 26F5 (SEQ ID NO 11) y la secuencia de aminoácidos (Fig. 6B) de la región variable de la cadena kappa del anticuerpo anti-IL-1 R1 26F5 (SEQ ID NO 12).

Las Figuras 7A-7B representan una secuencia de ADNc (Fig. 7A) que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-IL-1 R1 27F2 (SEQ ID NO 13) y la secuencia de aminoácidos (Fig. 7B) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-IL-1 R1 27F2 (SEQ ID NO 14).

Las Figuras 8A-8B representan una secuencia de ADNc (Fig. 8A) que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-IL-1 R1 15C4 (SEQ ID NO 15) y la secuencia de aminoácidos (Fig. 8B) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-IL-1 R1 15C4 (SEQ ID NO 16).

Las Figuras 9A-9B representan una secuencia de ADNc (Fig. 9A) que codifica la región variable de la cadena kappa del anticuerpo anti-IL-1 R1 15C4 (SEQ ID NO 17) y la secuencia de aminoácidos (Fig. 9B) de la región variable de la cadena kappa del anticuerpo anti-IL-1 R1 15C4 (SEQ ID NO 18).

La Figura 10 muestra la alineación de una secuencia de aminoácidos de regiones variables de la cadena pesada (sin secuencia líder) de anticuerpos anti-IL-1R1 designados 15C4 (SEQ ID NO 80, 85), 27F2 (SEQ ID NO 82, 87) y 26F5 (SEQ ID NO 84, 89). Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) están subrayadas. La CDR1 para 26f5 está designada en la SEQ ID NO 61; para 27F2 está designada en la SEQ ID NO 62; para 15C4 está designada en la SEQ ID NO 63. La CDR2 para 26F5 está designada en la SEQ ID NO 64; para 27F2 está designada en la SEQ ID NO 65; para 15C4 está designada en la SEQ ID NO 66. La CDR3 para 26F5 está designada en la SEQ ID NO 67; para 27F2 está designada en la SEQ ID NO 68; para 15C4 está designada en la SEQ ID NO 69.

La Figura 11 muestra la alineación de una secuencia de aminoácidos de regiones variables de la cadena ligera (sin secuencia líder) de anticuerpos anti-IL-1R1-y designados 15C4 (SEQ ID NO 81, 86), 27F2 (SEQ ID NO 83, 88) y 26F5 (SEQ ID NO 83, 88). La CDR1 para 26F5/27F2 está designada en la SEQ ID NO 70; para 15C4 está designada en la SEQ ID NO 71. La CDR2 para 26F5/27F2 está designada en la SEQ ID NO 72; para 15C4 está designada en la SEQ ID NO 73. La CDR3 para 26F5/27F2 está designada en la SEQ ID NO 74; para 15C4 está designada en la SEQ ID NO 75.

La Figura 12 es un gráfico que ilustra el efecto inhibitorio de los anticuerpos anti-IL1R1 sobre la formación del complejo IL-1 R/IL-1 β /IL-1 RAcP.

La Figura 13 es un gráfico que muestra el efecto inhibitor de un anticuerpo monoclonal anti-IL1R1 como se describe en el presente documento y se designa 15C4 la formación del complejo IL-1 R/IL-1 α /IL-1 RacP.

5 La Figura 14 es un gráfico que representa la capacidad de los anticuerpos anti-IL-1 R1 para bloquear la unión de IL-1 β sin interferir significativamente en la unión de IL-1ra en comparación con la IgG control.

10 La Figura 15A es un gráfico que muestra la inhibición de la producción de IL-6 en los condrocitos humanos primarios mediante anticuerpos anti-IL-1R1 identificados en el presente documento y designados 15C4, 26F5 y 27F2 en comparación con el IL-1 ra.

La Figura 15B es un gráfico que muestra la inhibición de la producción de IL-6 en los condrocitos humanos primarios mediante IL-1 ra y los anticuerpos monoclonales 15C4 y 27F2 en comparación con la clase de anticuerpos monoclonales representados por 10H7 y 24E12.

15 La Figura 16 es un gráfico que muestra la inhibición de la producción de IL-6 en sangre entera humana por los anticuerpos monoclonales anti-IL-1R1 designados 15C4, 26F5 y 27F2 en comparación con el IL-1 ra.

20 La Figura 17 representa las secuencias del 3er 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.

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

30 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 3er dominio, (III) bloqueantes de RacP del epítipo del 3er dominio y (IV) bloqueantes de IL-1 del epítipo del 1º/2º dominio.

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

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

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

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

45 La Figura 24 representa la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO 60) de una proteína quimérica IL-1R1-FLAG de cinomolgo-avidina. La avidina de pollo recombinante (en cursiva) se une al dominio extracelular maduro de IL-1E1 de cinomolgo (subrayado con la marca FLAG en el extremo C en negrita) a través de un ligador de 6 aminoácidos. Cuatro aminoácidos de IL-1R1 humano que se introdujeron solos y en combinación con la secuencia de cinomolgos están en negrita bajo la secuencia de cinomolgos. El epítipo 4 está en negrita, cursiva y subrayado.

50 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.

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

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

60 Descripción detallada de ciertas realizaciones preferidas

Los encabezados de sección usados en el presente documento 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 natural o inducida experimentalmente está asociada con niveles elevados de IL-1 en fluidos o tejidos corporales 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 superan los que normalmente se encuentran en una célula o tejido concreto, 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 reconoce 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 regulación por aumento 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 la IL-1. En la mayoría de las enfermedades mediadas por la IL-1 se cumplen al menos dos de las tres condiciones y en muchas enfermedades mediadas por la IL-1 se cumplen las tres condiciones.

Una lista no exclusiva de enfermedades mediadas por la IL-1 agudas y crónicas incluye, entre otras, las siguientes: pancreatitis aguda; esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Alzheimer; caquexia/anorexia, incluida la caquexia inducida por SIDA, asma y otras enfermedades pulmonares, aterosclerosis, vasculitis autoinmunitaria, 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) u derivación aortocoronaria; cáncer, tal como mieloma múltiple y leucemia mielógena (p. ej., LMA o LMC) y otras leucemias, así como metástasis tumorales; diabetes (por ejemplo, diabetes dependiente de insulina); endometriosis; fiebre; fibromialgia; glomerulonefritis; enfermedad del injerto contra el huésped/rechazo de transplante; shock hemorrágico; hiperalgesia, enfermedad intestinal inflamatoria, afecciones inflamatorias de una articulación, incluyendo osteoartritis, artritis psoriásica y artritis reumatoide; enfermedad ocular inflamatoria, como la asociada con, por ejemplo, transplante de córnea; isquemia, incluyendo isquemia cerebral (por ejemplo, lesión cerebral como resultado de traumatismo, epilepsia, hemorragia o ictus, cada uno de los cuales puede conducir a neurodegeneración); enfermedad de Kawasaki; alteración del aprendizaje; enfermedades pulmonares (por ejemplo, SDR), esclerosis múltiple; miopatías (por ejemplo, metabolismo de proteína del músculo, especialmente en septicemia); 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, shock 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. Los procedimientos de la invención para tratar estas enfermedades agudas y crónicas mediadas por la IL-1, así como otras enfermedades y afecciones mediadas por la IL-1, se describen más adelante.

Se pueden usar técnicas convencionales para preparar ADN recombinante, realizar síntesis de oligonucleótidos, 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, como normalmente se efectúan en la técnica o tal como se describe en el presente documento. Las técnicas y procedimientos anteriores pueden realizarse, en general, de acuerdo con procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica y tal como se describen en varias referencias generales y más específicas que se citan y tratan a lo largo de la presente especificación. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura usada en relación con la química analítica, la química orgánica sintética y la química medicinal y farmacéutica descritas en el presente documento y los procedimientos y técnicas de laboratorio descritos en el presente documento son los bien conocidos y usados habitualmente en la técnica. Se pueden usar técnicas estándar para síntesis química, análisis químico, preparación farmacéutica, formulación y liberación, y tratamiento de pacientes.

Como se usa de acuerdo con la presente divulgación, se entenderá que los términos siguientes, a menos que se indique lo contrario, tal como se han empleado anteriormente y a lo largo de la divulgación tienen los significados siguientes:

La expresión "polinucleótido aislado" significa que el polinucleótido sujeto (1) no está asociado (de forma covalente o no covalente) con todo o una porción 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 asociada en la naturaleza o (3) no se produce en la naturaleza en asociación con ningún otro polinucleótido. Dicho polinucleótido aislado puede ser ADN genómico, ADNc, ARNm u otro ARN, de origen sintético o cualquier combinación de los mismos.

La expresión "proteína aislada" se denomina en el presente documento significa que una proteína sujeto (1) carece de al menos algunas otras proteínas con las que normalmente se encontrarían, (2) carece esencialmente de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo de la misma especie, (3) se expresa en una célula de una especie diferente, (4) se ha separado 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 porciones de una proteína con la que la "proteína aislada" está asociada en la naturaleza, (6) está asociada operablemente (mediante interacción covalente o no covalente) con un polipéptido con el que no está asociado en la naturaleza o (7) no se produce en la naturaleza. ADN genómico, ADNc, ARNm u otro ARN, de origen sintético o cualquier combinación de los mismos puede codificar dicha proteína aislada. Preferentemente, la proteína aislada carece sustancialmente de proteínas o polipéptidos u otros contaminantes que se encuentran en su ambiente natural que interferirían con su uso terapéutico, diagnóstico, profiláctico, de investigación o de otro tipo.

Los términos "polipéptido" o "proteína" significan una o más cadenas de aminoácidos, donde cada cadena comprende aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos y 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 naturales 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-IL1 R1. Por tanto, un "polipéptido" o una "proteína" pueden comprender una (denominado "monómero") o una pluralidad (denominado "multímero") de cadenas de aminoácidos.

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 natural o producido de forma recombinante. En ciertas 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, o 450 aminoácidos. Fragmentos polipeptídicos particularmente útiles incluyen dominios funcionales, incluidos dominios de unión. En el caso de un anticuerpo anti-IL1R1, fragmentos útiles incluyen, entre otros: una región de CDR, especialmente una región CDR3 de la cadena pesada o ligera; un dominio variable de una cadena pesada o ligera; una porción de una cadena de anticuerpo o solo su región variable, incluidas dos CDR; y similares.

La expresión "fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional", como se usa en el presente documento, 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 puede unirse a un ligando, de modo que se evita la unión del ligando a su receptor, interrumpiendo la respuesta biológica que es el resultado de la unión del ligando al receptor, o cualquier combinación de los mismos. Preferentemente, un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la invención se une específicamente a IL-1R1.

Los términos "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 ser humano. 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 natural. Asimismo, los términos "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 "operablemente unido" significa que los componentes a los que el término se aplica están en una relación que les deja llevar a cabo las funciones inherentes en condiciones adecuadas. Por ejemplo, una secuencia control "operablemente unida" a una secuencia codificadora de proteína está unida a ella de tal 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 sujeto puede efectuar la expresión y el procesamiento de las secuencias de codificación a las que está unida. La naturaleza de dichas secuencias control puede depender del organismo huésped. En realizaciones concretas, las secuencias control para procariontes pueden incluir un promotor, un sitio de unión al ribosoma y secuencia de terminación de la transcripción. En otras realizaciones concretas, las secuencias control para eucariotes 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 ciertas realizaciones, las "secuencias control" pueden incluir secuencias líder y/o secuencias pareja de fusión.

El término "polinucleótido" significa polímeros de ácido nucleico monocatenario o bicatenario de al menos 10 bases de longitud. En ciertas 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, fosforoanilotoato, fosforoaniladato y fosforoamidato. El término incluye formas

monocatenarias y bicatenarias 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 preferidas, los oligonucleótidos tienen una longitud de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 a 40 bases. Los oligonucleótidos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, por ejemplo para usar en la construcción de un gen mutante. Los oligonucleótidos de la invención pueden ser oligonucleótidos sentido o antisentido.

La expresión "nucleótidos naturales" incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. La expresión "nucleótidos modificados" incluye nucleótidos con grupos de azúcar modificados o sustituidos o modificadas o sustituidos. La expresión "enlaces oligonucleotídicos" incluye enlaces tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotoato, fosforoaniladato, fosforoamidato y similares. Véase, por ejemplo, LaPlanche y col. (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, pp. 87-108 (F. Eckstein, ed.), Oxford University Press, Oxford England; Stec et al., patente de EE.UU. n° 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 huésped.

La expresión "vector de expresión" o "construcción de expresión" se refiere a un vector que es adecuado para la transformación de una célula huésped y contiene secuencias de ácido nucleico que dirigen y/o controlan (junto con la célula huésped) 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 operablemente a la misma.

La expresión "célula huésped" significa una célula que se ha transformado, 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 a la estructura 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 eucariotas por retrovirus.

El término "transfección" significa la captación de ADN extraño o exógeno por una célula y una célula se ha "transfectado" cuando se ha introducido el ADN exógeno dentro de la membrana celular. En el presente documento se divulga una serie de técnicas de transfección que son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, 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 usar para introducir uno o más restos de ADN exógeno en células huésped adecuadas.

El término "transformación" se refiere a un cambio en las características genéticas de la célula y una célula se ha transformado cuando se ha modificado para contener ADN nuevo. Por ejemplo, una célula se transforma cuando está 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 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 porción de una molécula a la que se puede unir un agente de unión selectivo, tal como un anticuerpo, y, además, puede usarse en un animal para producir anticuerpos capaces de unirse a un epítipo de dicho antígeno. Un antígeno puede tener uno o más epítopos.

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 ciertas realizaciones, los determinantes epitópicos incluyen grupos de superficie químicamente de moléculas, tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo, orosulfonilo y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales, así como características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que está unido a un anticuerpo. En ciertas 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, más preferentemente, cuando la constante de disociación es menor o igual a aproximadamente 10 pM.

- 5 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, como puede ser el caso determinado por la correspondencia entre secuencias de dos o más nucleótidos o dos o más aminoácidos. "Identidad" mide el porcentaje de correspondencias idénticas entre la menor de dos o más secuencias con
10 alineaciones de hueco (si hay alguna) abordadas por un modelo matemático o programa informático concreto (es decir, "algoritmos").

- El término "similitud" se usa en la técnica con respecto a un concepto relacionado; no obstante, en contraste con "identidad", "similitud" se refiere a una medida de la relación que incluye correspondencias idénticas y correspondencias 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 hay sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad sigue siendo el 50 %, pero el porcentaje de similitud sería 75 % (15/20). Por tanto, en los casos donde hay sustituciones conservadoras, el porcentaje de similitud entre dos polipéptidos será mayor que el
15 porcentaje de identidad entre dichos dos polipéptidos.
20

- La identidad y similitud de los ácidos nucleicos y polipéptidos relacionados se pueden calcular fácilmente mediante procedimientos conocidos. Tales procedimientos incluyen, entre otros, los descritos en Computational Molecular Biology, (Lesk, A.M. ed., Oxford University Press, New York; Biocomputing: Informatics y Genome Projects, (Smith, D.W., ed.), 1993, Academic Press, New York; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, (Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds.), 1994, Humana Press, New Jersey; von Heinje, G., Sequence Analysis in Molecular Biology, 1987, Academic Press; Sequence Analysis Primer, (Gribskov, M. y Devereux, J., eds.), 1991, M. Stockton Press, New York; Carillo et al., 1988, SIAM J. Applied Math. 48:1073; y Durbin et al., 1998, Biological Sequence Analysis, Cambridge University Press.
25
30

- Se diseñan procedimientos preferidos para determinar la identidad para dar la mayor coincidencia entre las secuencias analizadas. Además, los procedimientos para determinar la identidad se codifican en programas informáticos disponibles para el público. Los procedimientos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, entre otros, el paquete del programa GCG, incluido GAP (Devereux, J., y col., Nucl. Acid. Res., 12:387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI, BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul y col., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990)). El programa BLASTX está públicamente disponible por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information) (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul y col., NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul y col., (1990, anteriormente). También se puede usar el algoritmo bien conocido de SmithWaterman para determinar la identidad.
35
40

- 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 procedimiento de alineación seleccionado (programa GAP) tendrá como resultado una alineación que abarca al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido diana.
45

- Por ejemplo, usando el algoritmo informático GAP (Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, WI), dos polipéptidos para los que va a 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 ciertas realizaciones, una sanción por apertura de huecos (que se calcula normalmente como tres veces la diagonal promedio; donde la "diagonal promedio" es el promedio de la diagonal de la matriz de comparación que está usándose; la "diagonal" es la puntuación o número asignado a cada aminoácido perfecto apareado mediante la matriz de comparación concreta) 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 ciertas realizaciones, el algoritmo también usa una matriz de comparación convencional (véase Dayhoff y col, Atlas of Protein Sequence and Structure, 5(345)(1978) para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci USA 89:1091510919 para la matriz de comparación BLOSUM 62).
50
55

- 60 En ciertas realizaciones, los parámetros para la comparación de secuencias de polipéptidos incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman et al. (1970), J. Mol. Biol. 48:443-453;

Matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff y col., (1992) anteriormente;

65

Sanción por hueco: 12

Sanción de longitud de hueco: 4

5 Umbral de similitud: 0

El programa GAP puede ser útil con los parámetros anteriores. En ciertas 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.

10 El término "natural", como se usa para hacer referencia a los aminoácidos, se refiere a los veinte aminoácidos convencionales. Véase *Immunology - A Synthesis*, 2ª Edición, (E.S. Golub y D. R. Gren, Eds.) Sinauer Associates: Sunderland, MA (1991)

15 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 compuesto no peptídico se denominan "miméticos peptídicos" o "peptidomiméticos". Véase Fauchere (1986), *Adv. Drug Res.* 15:29; Veber & Freidinger, 1985, *TINS* p.392; y Evans et al. (1987), *J. Med. Chem.* 30:1229.

20 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 del grupo constituido por: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}$ -(cis y trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_2\text{SO}-$, mediante procedimientos 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 ciertas 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 procedimientos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61 :387 (1992); por ejemplo, mediante la adición de residuos internos de cisteína capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

35 "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 por la unión específica e incluye anticuerpos biespecíficos quiméricos, humanizados y completamente humanos. En ciertas 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, entre otros, Fab, Fab', $\text{F}(\text{ab}')_2$, Fv y anticuerpos de cadena sencilla.

40 La expresión "cadena pesada" incluye una cadena pesada de longitud completa y fragmentos de la misma que tienen una secuencia de 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, $\text{C}_\text{H}1$, $\text{C}_\text{H}2$ y $\text{C}_\text{H}3$. El dominio V_H está en el extremo amino del polipéptido y el dominio $\text{C}_\text{H}3$ está en el extremo carboxilo.

45 La expresión "cadena ligera" incluye una cadena ligera de longitud completa y fragmentos de la misma que tienen una secuencia de 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 . Como la cadena pesada, el dominio de la región variable de la cadena ligera está en el extremo amino del polipéptido.

50 Un "fragmento Fab" está compuesto por una cadena ligera y las regiones $\text{C}_\text{H}1$ y variable de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un puente disulfuro con otra molécula de la cadena pesada.

55 Un "fragmento Fab'" contiene una cadena ligera y una cadena pesada que contiene más de la región constante, entre los dominios de $\text{C}_\text{H}1$ y $\text{C}_\text{H}2$, de modo que se puede formar un enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas para formar una molécula $\text{F}(\text{ab}')_2$.

60 Un "fragmento $\text{F}(\text{ab}')_2$ " contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una porción de la región constante entre los dominios $\text{C}_\text{H}1$ y $\text{C}_\text{H}2$, de modo que se puede formar un enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas.

La "región Fv" comprende las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, pero carece de las regiones constantes.

65

“Anticuerpos de cadena sencilla” son moléculas Fv donde las regiones variables de la cadena pesada y ligera se han conectado mediante un ligador flexible para formar una cadena polipeptídica sencilla, que forma una región de unión a antígeno. Los Anticuerpos de cadena sencilla se tratan con detalle en la publicación de solicitud de patente internacional nº WO 88/01649 y las patentes de EE.UU. nº 4.946.778 y 5.260.203.

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

10 Un anticuerpo “bienespecífico” o “afuncional” es un anticuerpo híbrido que tiene dos pares de cadena pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos bienespecíficos se pueden producir mediante diversos procedimientos, incluidos, entre otros, fusión de hibridomas o unión del fragmento Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann (1990), Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321; Kostelny et al. (1992), J. Immunol. 148:1547-1553.

15 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).

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

25 Los términos “marcador” o “marcado” se refiere a la incorporación de un marcador detectable, por ejemplo mediante incorporación de un aminoácido radiomarcado o la fijación a un polipéptido de restos de biotina que se puede detectar mediante avidina marcada (p. ej., estreptavidina que, preferentemente, 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 ciertas realizaciones, el marcador también puede ser terapéutico. En la técnica se conocen varios procedimientos de marcaje de polipéptidos y glicoproteínas y se pueden usar de forma ventajosa en los procedimientos divulgados en el presente documento. Ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, entre otros, 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, β-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, marcadores de hapteno tales como grupos de biotilo y epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (p. ej., pares de secuencias en cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, colas del epítopo). En ciertas realizaciones, los marcadores están unidos por brazos espaciadores (tales como (CH₂)_n, donde n < aproximadamente 20) de varias longitudes para reducir la potencial hidrancia estérica.

40 La expresión “muestra biológica” incluye, entre otros, cualquier cantidad de una sustancia de algo vivo o algo antes vivo. Dichos algos vivos incluyen, entre otros, seres humanos, ratones, monos, ratas, conejos y otros animales. Dichas sustancias incluyen, entre otros, 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.

45 El término “paciente” incluye sujetos humanos y veterinarios.

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

50 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, Eds.) Sinauer Associates: Sunderland, MA (1991). Los estereoisómeros (p. ej., D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como aminoácidos α-, α-disustituidos, N-alquilaminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos de la presente invención. Ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ-carboxiglutamato, ε-N,N,N-trimetilisina, ε-N-acetilisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxisina, σ-N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (p. ej., 4-hidroxiprolina). En la notación polipeptídica usada en la presente memoria descriptiva, la dirección izquierda es la dirección aminoterminal y la dirección derecha es la dirección carboxiterminal, de acuerdo con el uso estándar y la convención.

65 De forma similar, a menos que se especifique lo contrario, el extremo izquierdo de las secuencias de polinucleótidos monocatenarias es el extremo 5'; la dirección izquierda de las secuencias de polinucleótidos bicatenarias 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 hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ADN y son 5' al extremo 5' del transcrito de ARN se denominan "secuencias corriente arriba"; las regiones de la secuencia en la hebra 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 corriente abajo".

5 Se apreciará que los residuos de aminoácidos naturales pueden dividirse en clases basándose en propiedades de cadena lateral comunes:

1) Hidrófobos: norleucina (Nor o Nle), Met, Ala, Val, Leu, Ile;

10 2) Hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

3) Ácidos: Asp, Glu;

15 4) Básicos: His, Lys, Arg;

5) Residuos que influyen en la orientación de las cadenas: Gly, Pro; y

20 6) Aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones de aminoácidos no conservadoras pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases con un miembro de la misma clase. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras pueden abarcar residuos de aminoácidos no naturales, que normalmente 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.

30 Al realizar dichas sustituciones, de acuerdo con ciertas realizaciones, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. A cada aminoácido 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).

40 Generalmente, en la técnica se entiende la importancia del índice hidropático de los aminoácidos a la hora de conferir la función biológica interactiva sobre una proteína (véase, por ejemplo, Kyte y col., J. Mol. Biol., 157:105-131). Se sabe que ciertos aminoácidos se pueden sustituir por 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 ciertas realizaciones, se incluyen los que están dentro de ± 1 , y, en ciertas realizaciones, están incluidos aquéllos dentro de $\pm 0,5$.

45 También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares se puede realizar de forma eficaz sobre la base de la hidrofobicidad, particularmente cuando la proteína o péptido biológicamente funcional creado de este modo está destinado al uso en realizaciones inmunológicas, como se divulgan en el presente documento. En ciertas realizaciones, la hidrofobicidad promedio local mayor de una proteína está dirigida por la hidrofobicidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigeneidad, es decir con una propiedad biológica de la proteína.

50 A estos residuos de aminoácidos se les ha asignado los siguientes valores de hidrofobicidad: 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 hidrofobicidad similares, en ciertas realizaciones se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofobicidad están dentro de ± 2 , en ciertas realizaciones se incluyen los que están dentro de ± 1 y en ciertas realizaciones se incluyen aquéllos dentro de $\pm 0,5$. También se pueden identificar epítomos de secuencias de aminoácidos primarias sobre la base de la hidrofobicidad. Estas regiones también se denominan "regiones centrales epitópicas".

Ejemplos de sustituciones de aminoácidos se exponen en la Tabla 1.

65

Tabla 1

Sustituciones de aminoácidos		
Residuos originales	Ejemplos de sustituciones	Sustituciones preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gin, Asn	Lys
Asn	Gin	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gin, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucine	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 ácido diamino-butírico, 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

5 Un experto en la técnica podrá determinar variantes adecuadas de los polipéptidos, tal como se expone en el presente documento, usando técnicas bien conocidas. En ciertas realizaciones, un experto en la técnica puede identificar áreas 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 o porciones de las moléculas que están conservados entre polipéptidos similares. En realizaciones adicionales, incluso las áreas 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 10 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. En 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 15 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.

El experto en la técnica también puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con dicha estructura en polipéptidos similares. En vista de tal información, los expertos en la técnica pueden predecir la alineación de restos de aminoácidos de un anticuerpo con respecto a su estructura de tres dimensiones. En ciertas realizaciones, un experto en la técnica puede elegir no realizar cambios 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 20 después se pueden seleccionar 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 de rutina, el experto en la técnica puede fácilmente determinar los aminoácidos donde se deben evitar las sustituciones, bien solas o en combinación con otras mutaciones.

5 Se han dedicado numerosas publicaciones científicas a la predicción de la estructura secundaria. Véase Moulton, 1996, *Curr. Op. en 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 procedimiento de predicción de la estructura
10 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 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 protección potenciada de la estructura secundaria, incluyendo el número potencial de plegamientos dentro de una estructura de los polipéptidos o proteínas. Véase Holm et al., 1999, *Nucl. Acid. Res.* 27:244-247. Se
15 ha sugerido (Brenner y col., *Curr. Op. Struct. Biol.*, 7(3): 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 notablemente más precisa.

20 Procedimientos 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-).

25 En ciertas realizaciones, las variantes de anticuerpos incluyen variantes de glicosilación donde el número y/o tipo del sitio de glicosilación se han alterado en comparación con las secuencias de aminoácidos del polipéptido parental. En ciertas 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, 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 posible sitio nuevo para la
30 adición de una cadena de hidrato de carbono unida a N. Como alternativa, las sustituciones que eliminan esta secuencia retirarán una cadena de hidrato de carbono unida a N existente. También se proporciona una reorganización de cadenas de hidratos de carbono unidas a N, donde se eliminan uno o más sitios de glicosilación unidos N (normalmente 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 donde uno o más residuos de
35 cisteína se delecionan o sustituyen por otro aminoácido (p. ej., serina) en comparación con la secuencia de aminoácidos parental. Las 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 de cisteína que la proteína nativa y normalmente tienen un número par para minimizar las interacciones resultantes de cisteínas no apareadas.

40 De acuerdo con ciertas realizaciones, las sustituciones aminoacídicas son aquellas 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 fisicoquímicas o funcionales de dichos polipéptidos. De acuerdo con ciertas realizaciones, las sustituciones sencillas
45 o múltiples de aminoácidos (en ciertas realizaciones, sustituciones conservadoras de aminoácidos) pueden realizarse en la secuencia natural (en ciertas realizaciones en la porción del polipéptido fuera del(los) dominio(s) 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
50 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, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, eds.) 1991, Garland Publishing, New York. N.Y. (1991)); y Thornton y col. (1991), *Nature* 354:105.

55 Preparación de anticuerpos

Las unidades estructurales de los anticuerpos naturales normalmente comprenden un tetrámero. Cada uno de estos tetrámeros normalmente está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, donde cada par tiene
60 una cadena ligera de longitud completa (normalmente de un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una cadena pesada de longitud completa (normalmente de un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena normalmente incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que normalmente es responsable del reconocimiento del antígeno. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas normalmente se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas normalmente se
65 clasifican 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, gg1, IgG2, IgG3, e IgG4. La IgM tiene varias

subclases, incluidas, entre otras, IgM 1 e IgM2. La IgA se subdivide de forma similar en subclases, incluidas, entre otras, IgA1 e IgA2. Dentro de las cadenas ligera y pesada de longitud completa, normalmente una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos une la región variable y las regiones constantes, la cadena pesada también incluye una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase, por ejemplo, *Fundamental Immunology*, Ch. 7, 2nd ed., (Paul, W., ed.), 1989, Raven Press, N.Y.

La combinación de las regiones variantes de cada par de cadena ligera/cadena pesada normalmente forma el sitio de unión a antígeno.

Las regiones variables de cada una de las cadenas pesadas y cadenas ligera normalmente exhiben la misma estructura general que comprende cuatro regiones estructuras (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de la complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par normalmente están alineadas por las regiones estructurales, alineación que puede permitir la unión a un epítipo específico. Del extremo N al extremo C, las regiones variables de tanto las cadenas ligeras como las pesadas normalmente comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio normalmente se realiza de acuerdo con las definiciones de Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991, National Institutes of Health, Bethesda, Md.), Chothia & 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 usando cualquier procedimiento que produce moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Ejemplos de procedimientos adecuados para preparar anticuerpos monoclonales incluyen los procedimientos de hibridoma de Kohler et al. (1975, *Nature* 256:495-497) y el procedimiento de hibridoma de células B (Kozbor, 1984, *J. Immunol.* 133: 3001; y Brodeur et al., 1987, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, (Marcel Dekker, Inc., New York), pp. 51-63).

Los anticuerpos monoclonales se pueden modificar para usar como terapéuticos. Un ejemplo es un anticuerpo "quimérico" donde una porción de la cadena pesada y/o la cadena ligera es idéntica u homóloga a una correspondiente secuencia en los anticuerpos derivados de una especie concreta o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpo concreto, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es/son idénticas u homólogas a una secuencia correspondiente en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo. Otros ejemplos son fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada. Véase, la patente de EE.UU. n° 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", donde el anticuerpo comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una especie concreta o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpo concreto, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es/son idénticas u homólogas a una secuencia correspondiente en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo.

Otro desarrollo es el anticuerpo "humanizado". En la técnica se conocen procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos (Véanse las patentes de EE.UU. n° 5.585.089 y 5.693.762). En general, un anticuerpo humanizado se produce en un animal no humano y, después, ciertos residuos de aminoácidos, normalmente de porciones que no reconocen antígenos del anticuerpo, se modifica para que sea homólogo a dichos residuos en un anticuerpo humano del isotipo correspondiente. La humanización se puede realizar, por ejemplo, usando procedimientos 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 porción 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 producción de inmunoglobulina de ratón endógena, dichos anticuerpos se producen mediante inmunización con un antígeno (que normalmente 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 procedimientos, 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 para obtener un animal que tiene todas las modificaciones deseadas del sistema inmunitario. Cuando se administra un inmunógeno, estos animales transgénicos producen anticuerpos que son inmunoespecíficos de estos antígenos que tienen secuencias de aminoácidos humanas (en lugar de murinas), incluidas las regiones variables. Véanse las publicaciones PCT W096/33735 y W094/02602. Procedimientos adicionales se describen en la patente de EE.UU. n° 5,545,807, las publicaciones de PCT N° 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

huésped o mediante la expresión en células de hibridoma, como se describe en el presente documento.

Los anticuerpos completamente humanos también se pueden producir a partir de bibliotecas de expresión en fagos (como se divulga en Hoogenboom et al., 1991, J. Mol. Biol. 227:381; y Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581).

5 Estos procesos simulan la selección inmunitaria a través de la expresión de repertorios de anticuerpos sobre la superficie de bacteriófagos filamentosos y la posterior selección de fagos mediante su unión a un antígeno de elección. Una de estas técnicas se describe en la publicación PCT nº W099/10494, que describe el aislamiento de anticuerpos de alta afinidad y agonistas funcionales para receptores de MPL, y msk, usando dicho abordaje.

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

15 La invención proporciona uno de una pluralidad de anticuerpos monoclonales completamente humanos contra IL-1R1 humano. Preferentemente, los anticuerpos se unen al tercer dominio de IL-1 R1. En realizaciones preferidas, la invención proporciona secuencias nucleotídicas 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 (CDR), 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.

25 La capacidad para clonar y reconstruir loci humano de tamaño de megabases en cromosomas artificiales de levadura (YAC) y para introducirlos en la línea germinal de ratón proporciona un abordaje ventajoso para deducir los componentes funcionales de loci muy grandes mapeados, 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.

30 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 donde 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 (MAb) humanos, particularmente para usar como agentes terapéuticos. Cabe esperar que los anticuerpos completamente humanos minimicen las respuestas inmunogénicas y alérgicas intrínsecas a Mab 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, el tratamiento de las mismas requiere la administración repetida de anticuerpos.

45 Un experto en la técnica puede realizar ingeniería genética de 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 génica variable, 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 Mab humanos específicos de antígeno con la especificidad deseada.

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

60 Las CDR de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos anti-IL-1 R1 de la invención se pueden injertar en las regiones estructurales (FR) de la misma, u otra, especie. En ciertas realizaciones, los CDR de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos anti-IL-1 R1 se pueden injertar en FR humanos consenso. Para crear FR humanas consenso, las FR de varias secuencias de aminoácidos de la cadena pesada o la cadena ligera humanas se alinean para identificar una secuencia de aminoácidos consenso. Las FR de la cadena pesada o la cadena ligera del anticuerpo anti-IL-1 R1 se pueden sustituir con las FR de una cadena pesada o cadena ligera diferente. Los aminoácidos raros en las FR de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo

anti-IL-1 R1 normalmente no se reemplazan, mientras que el resto de los aminoácidos de FR se pueden sustituir. Los aminoácidos raros son aminoácidos específicos que están en posiciones donde normalmente no se encuentran en las FR. Las regiones variables injertadas de anticuerpos anti-IL-1 R1 de la invención se pueden usar con una región constante que es diferente de la región constante del anticuerpo anti-IL-1 R1. Como alternativa, las regiones variables injertadas son parte de un anticuerpo Fv de una sola cadena. El injerto de CDR se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N° 6,180,370, 5,693,762, 5,693,761, 5,585,089, y 5,530,101.

En ciertas 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 pesada humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 72 o SEQ ID NO 73; y/o una región CDR3 de la cadena pesada humana que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 74 o SEQ ID NO 75.

Los anticuerpos de la invención se preparan, preferentemente, usando ratones transgénicos que tienen una porción sustancial del locus productor del anticuerpo humano insertado en las 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 usadas para alcanzar este resultado se divulgan en las patentes, solicitudes y referencias divulgadas en la especificación del presente documento. En realizaciones preferidas, el trabajador experto puede usar procedimientos tales como los divulgados en la publicación de la solicitud de patente internacional n° WO 98/24893, que se incorpora en el presente documento por referencia para cualquier fin. Véase también Mendez et al., 1997, *Nature Genetics* 15:146-156.

Los anticuerpos monoclonales (Mab) de la invención se pueden producir mediante diversas técnicas, incluida la metodología de anticuerpos monoclonales convencionales, por ejemplo la técnica de hibridación de células somáticas estándar de Kohler y Milstein, 1975, *Nature* 256:495. Aunque se prefieren los procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio se pueden usar otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

En una realización preferida, los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra IL-1 R1 se pueden generar usando 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. De acuerdo con esto, los ratones exhiben menor expresión de IgM o κ y en respuesta a la inmunización, los transgenes de la cadena pesada y ligera humanas sufren desplazamiento 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; Tuailon et al., 1994, *J. Immunol.* 152:2912-2920; Lonberget 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 & Huszar, 1995, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93; Harding & Lonberg, 1995, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546; Fishwild et al., 1996, *Nature Biotechnology* 14:845-851, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. Véanse también las patentes de EE.UU. números 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; all to Lonberg y Kay, así como la patente de EE.UU. n° 5,545,807 de 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.

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

De forma ventajosa, los anticuerpos monoclonales completamente humanos específicos de IL-1 R1 se producen del siguiente modo. Los ratones transgénicos que contienen genes de inmunoglobulina humana se inmunizan con el antígeno relacionado con IL-1 R1 de interés. Se obtienen células linfáticas (tales como los linfocitos 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 someten a detección selectiva y se seleccionan para identificar las líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos específicos del antígeno de interés. En ciertas realizaciones, se proporciona la producción de una línea celular de hibridoma que produce anticuerpos específicos de IL-1 R1.

En realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención son producidos por líneas de hibridoma. En estas realizaciones, los anticuerpos de la invención se unen al IL-1 R1 con una constante de disociación (K_d) de entre aproximadamente 4 pM y 100 pM. En ciertas realizaciones de la invención, los anticuerpos se unen al IL-1 R1 con una K_d inferior a aproximadamente 20 pM. En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención se unen al tercer dominio de IL-1 R1. Las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos del tercer dominio de IL1 -R1 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 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 concretas, las regiones variables de los anticuerpos está ligadas a una región constante distinta a la región constante del isotipo IgG1, IgG2 o IgG4. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención se han clonado para expresión en células de mamífero.

En ciertas realizaciones, las sustituciones conservadoras de aminoácidos en las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-IL-1 R1 (y las correspondientes modificaciones en los nucleótidos codificadores) producirán anticuerpos anti-IL-1 R1 que tienen características funcionales y químicas similares a las del anticuerpo anti-IL-1 R1. En contraste con esto se pueden realizar modificaciones sustanciales en las características funcionales y/o químicas del anticuerpo anti-IL-1 R1 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 armazón molecular en el área 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 grueso de la cadena lateral.

Por ejemplo, una "sustitución de aminoácido 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 de aminoácido en dicha posición. Además, cualquier residuo nativo en el polipéptido se puede sustituir también con alanina, como se ha descrito anteriormente para "mutagénesis que abarca alanina" (Wells, 1991, *Methods Enzymol.* 202:390 (ed. J.J. Langone), Academic Press, London).

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

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 concretos para la transformación de una célula huésped de mamífero adecuada. De acuerdo con estas realizaciones, la transformación se puede conseguir usando cualquier procedimiento conocido para introducir polinucleótidos en una célula huésped, incluidos, por ejemplo, envasado del polinucleótido en un virus (o en un vector viral) y transducción en una célula huésped con el virus (o vector) o mediante procedimientos de transfección conocidos en la técnica. Dichos procedimientos 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 procedimiento de transformación usado puede depender del huésped que se va a transformar. En la técnica se conocen bien procedimientos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero e incluyen, entre otros, transfección mediada por dextrano, precipitación en fosfato cálcico, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del(los) polinucleótido(s) en liposomas y microinyección directa del ADN en los núcleos.

De acuerdo con ciertas realizaciones de los procedimientos 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 usando técnicas de unión estándar. 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 adecuada y se liga en un vector de expresión. Normalmente, el vector se selecciona de modo que sea funcional en la célula huésped concreta empleada (es decir, el vector es compatible con la maquinaria de la célula huésped 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 (ed.), 1990, *Meth. Enzymol.* Vol. 185, Academic Press. N.Y.

Normalmente, los vectores de expresión usados en cualquiera de las células huésped contendrán secuencias para mantenimiento de plásmidos y para clonación y expresión de secuencias nucleotídicas exógenas. Dichas secuencias, en conjunto denominadas "secuencias flanqueantes", en ciertas realizaciones, normalmente incluirán 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 aceptora, una secuencia que codifica una secuencia líder para la secreción de polipéptidos, un sitio de unión a ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región poliligadora para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido que se va a expresar y un elemento marcador

seleccionable. Cada una de estas secuencias se trata más adelante.

Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia que codifica una "marca", es decir una molécula de oligonucleótido localizada en el extremo 5' o 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 de condensa con el polipéptido tras la expresión del polipéptido y puede servir como medio para purificación por afinidad o detección del anticuerpo de IL-1 R1 de la célula huésped. La purificación por afinidad se puede conseguir mediante, por ejemplo, cromatografía en columna usando anticuerpos contra la marca como matriz de afinidad. Opcionalmente, la marca puede eliminarse después del polipéptido IL-1 R1 purificado por varios medios, tal como usando ciertas peptidasas para escisión.

Las secuencias flanqueantes pueden ser homólogas (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula huésped), heterólogas (es decir, de una especie distinta a la especie o cepa de la célula huésped, 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 planta, siempre que la secuencia flanqueante sea funcional en la maquinaria de la célula huésped y pueda ser activada por éste.

Las secuencias flanqueantes útiles e los vectores de la presente invención se pueden obtener mediante varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Normalmente, las secuencias flanqueantes útiles en la presente invención se han identificado previamente mediante mapeo 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 procedimientos descritos en el presente documento para síntesis de ácido nucleico o clonación.

Cuando se conoce toda, o sola una porción, de la secuencia flanqueante, se puede obtener usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o mediante detección selectiva de una biblioteca genómica 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 una pieza de ADN más grande que puede contener, por ejemplo, una secuencia de codificación 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 procedimientos conocidos para el experto en la técnica. La selección de enzimas adecuadas para conseguir este fin será evidente para los expertos en la técnica.

Normalmente, un origen de replicación es parte de los vectores de expresión procariontas adquiridos comercialmente y el origen ayuda en la amplificación del vector en la célula huésped. Si el vector de elección no contiene un origen 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 gramnegativas y varios orígenes virales (p. ej., SV40, poliovirus, adenovirus, virus de la estomatitis vesicular (VSV) o virus del papiloma, tal como HPV o BPV) son útiles para los vectores de clonación en células de mamífero. En general, el componente origen de replicación no es necesario para los vectores de expresión en mamífero (por ejemplo, el origen de SV40 a menudo se usa únicamente porque también contiene el promotor temprano del virus).

Normalmente, una secuencia de terminación de la transcripción se localiza en 3' hasta el final 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 una biblioteca, o incluso adquirirse comercialmente como parte de un vector, también se puede sintetizar fácilmente usando procedimientos para la síntesis de ácidos nucleicos, tales como las descritas en el presente documento.

Un gen marcador seleccionable codifica una proteína necesaria para la supervivencia y crecimiento de una célula huésped cultivada en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo ampicilina, tetraciclina o kanamicina para las células huésped procariontas, (b) complementan deficiencias autótrofas de la célula o (c) suministran nutrientes cruciales no disponibles en el medio complejo o el 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 usar un gen de resistencia a neomicina para la selección en células huésped procariontas y eucariotas.

Otros genes seleccionables se pueden usar para amplificar el gen que se va a 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 celular se repiten, en general en tándem, con los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Ejemplos de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero

incluyen la dihidrofolato reductasa (DHFR) y la timidina quinasa sin promotor. Los transformantes celulares de mamífero 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 en condiciones donde la concentración del agente de selección en el medio aumenta sucesivamente, de modo que lleva a la amplificación del gen seleccionable y 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.

Normalmente 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). Normalmente el elemento se localiza en 3' del promotor y en 5' de la secuencia de codificación del polipéptido que se va a expresar.

En algunos casos, tal como cuando se desea glicosilación en un sistema de expresión de células huésped eucarióticas, se pueden manipular varias pre o prosecuencias 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 añadir prosecuencias, 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. Como alternativa, 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 área dentro del polipéptido maduro.

La expresión y los vectores de clonación de la invención contendrán normalmente un promotor reconocido por el organismo huésped y operablemente unido a la molécula que codifica el anticuerpo anti-IL-1 R1. Los promotores son secuencias no traducidas localizada cadena arriba (es decir, en 5') del 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 pueden agrupar convenientemente en una de dos clases: Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles. Un promotor inducible inicia niveles aumentados de transcripción 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, hay poco o ningún control sobre la expresión génica. Se conoce bien un gran número de promotores, reconocidos por una diversidad de células huésped potenciales. Un promotor adecuado está unido operativamente al ADN que codifica la cadena pesada o la cadena ligera que comprende un anticuerpo anti-IL-1 R1 de la invención eliminando el promotor del ADN fuente por digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia promotora deseada en el vector.

Los promotores adecuados para el uso con levaduras huésped también son bien conocidos en la técnica. Los potenciadores de levaduras se usan de forma ventajosa con promotores de levadura. Los promotores adecuados para usar con células huésped de mamífero son bien conocidos e incluyen, entre otros, los obtenidos de los genomas de virus tales como el virus de I polio, el virus de la viruela, adenovirus (tal como Adenovirus 2), papilomavirus bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, retrovirus, virus de la hepatitis-B y, más preferentemente, el virus 40 de simio (SV40). Otros promotores de mamífero adecuados incluyen promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, promotores del shock térmico y el promotor de actina.

Promotores adicionales que pueden ser de interés incluyen, entre otros: La región promotora temprana 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 procariota, 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 usado 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 activo 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 (Mogam 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 del 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).

5 Una secuencia potenciadora 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-1 R1 de la invención por los 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 potenciadoras de genes de mamífero (p. ej., de globina, elastasa, albúmina, alfa-fetoproteína e insulina). No obstante, normalmente se usa un potenciador es un virus, El potenciador de SV40, el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma y potenciadores de adenovirus son elementos potenciadores ilustrativos para la activación de promotores eucariotas. Aunque un potenciador se puede 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.

10 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. Cuando en el vector ya no está presente una o más de las secuencias flanqueantes descritas en el presente documento, pueden obtenerse individualmente y ligarse en el vector. Los procedimientos para obtener cada una de las secuencias flanqueantes son bien conocidos para los expertos en la técnica.

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

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

25 En la técnica se conocen numerosas líneas celulares de mamífero como huéspedes para expresión e incluyen, entre otras, muchas líneas de células inmortalizadas disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), tales como, entre otras, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p. ej., Hep G2), además de otras. En ciertas realizaciones se pueden seleccionar líneas celulares determinando qué líneas celulares tienen niveles de expresión elevados y producir anticuerpos con propiedades de unión de IL-1 R1 constitutivas. En otra realización se puede seleccionar una línea celular del linaje de las células B que no fabrica sus propios anticuerpos pero que tiene capacidad para fabricar y secretar un anticuerpo heterólogo (p. ej., líneas de células de mieloma de ratón NSO y SP2/0).

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

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

40 En ciertas realizaciones, la invención proporciona procedimientos para tratar trastornos médicos asociados con reacciones inflamatorias mediadas por la IL-1 o reacciones inmunorreguladoras mediadas por la IL-1. Los procedimientos de la invención incluyen administrar un anticuerpo anti-IL1 R1 de la invención a un individuo que esté afectado con una enfermedad inflamatoria o inmunorreguladora que está mediada por la IL-1. Como se usa en el presente documento, los términos "enfermedad", "malestar", "afección médica" o "afección anormal" se usan de forma intercambiable con el término "trastorno médico".

65

En una realización concreta, los procedimientos de la invención implican administrar a un paciente un anticuerpo anti-IL1 R1 de la invención, de modo que se previene la unión de la IL-1 a su receptor de superficie celular (IL-1 R1).

5 Para tratar un trastorno médico caracterizado por la expresión anormal o en exceso de IL-2 o señalización anormal o en exceso de IL-1, una molécula que comprende un anticuerpo del IL-1R de tipo 1 de la presente 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 veces separadas por de 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
10 cuestionarios de la calidad de vida.

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

20 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 escogidos. Al tratar las 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 meses, o incluso una sola dosis, a menudo es suficiente para tratar las afecciones agudas.

25 Aunque la extensión 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.

30 Cualquier vía de administración eficaz se puede usar 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 procedimientos intranasales e inhalatorios. Otros medios adecuados de administración incluyen la liberación sostenida de implantes, inhalación por aerosol, gotas oculares, preparaciones orales, incluidas píldoras,
35 jarabes, pastillas o masticables, y preparaciones tópicas tales como lociones, geles, pulverizadores, pomadas u otras técnicas adecuadas. La administración mediante inhalación es particularmente beneficiosa cuando se tratan enfermedades asociadas con trastornos pulmonares.

40 En una realización de la invención se puede administrar un anticuerpo anti-IL-1 R1 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 divulgados en el presente documento. En otra realización más, 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. Como alternativa se puede administrar una dosis única cuya cantidad puede variar de 2-400 mg/dosis, 2-100 mg/dosis o de aproximadamente 10-80 mg/dosis. Si la dosis se va a administrar más de una vez a la semana, una dosis de ejemplo 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 una preparación aceptable para inyección que contiene el receptor de IL-1 a 80-100 mg/dosis o, como alternativa, 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 estándar. Por ejemplo, si la vía de administración es inhalación, la dosis puede ser de una a siete veces a la semana a intervalos de dosis de 10 mg/dosis a 50 mg por dosis.

55 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. Preferentemente, los materiales aceptables para formulación son no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleados. En realizaciones preferidas, se proporcionan las composiciones farmacéuticas que comprenden una
60 cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpos anti-IL-1 R1.

En ciertas 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, entre otros, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); agentes antimicrobianos; antioxidantes (tales como

ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrogenosulfito de sodio); tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos, otros ácidos orgánicos); agentes de carga (tales como manitol o glicina), agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminotetraacético (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 de dilución; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones de formación de sal (tal como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenílico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (tales como pluronics, PEG, ésteres de sorbitano, polisorbatos tales como polisorbato 20, polisorbato 80, tritón, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes potenciadores de la estabilidad (sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metal alcalino (preferentemente cloruro de sodio o potasio, manitol sorbitol)); vehículos de administración; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. Véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, (A.R Gennaro, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

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

En ciertas realizaciones, el vehículo o portador primario en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o portador adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente complementado con otros materiales habituales en composiciones para la administración parenteral. Otros ejemplos de vehículos 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, que puede incluir además sorbitol o un sustituto adecuado del mismo. En ciertas 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, ant) en forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Además, en ciertas realizaciones, el producto anticuerpo anti-IL-1 R1 puede formularse como liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.

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

Los componentes de formulación están presentes, preferentemente, en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. En ciertas realizaciones se usan 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.

Cuando se considera la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para su uso en la presente invención pueden proporcionarse en forma de una solución acuosa, parenteralmente aceptable, libre de pirógenos, que comprende el anticuerpo anti-IL-1 R1 deseado en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para inyección parenteral es agua destilada estéril donde el anticuerpo anti-IL-1 R1 se formula como una solución isotónica, estéril, conservada de manera apropiada. En ciertas realizaciones, otra preparación más puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (tal como ácido poliláctico), ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que puede proporcionar la liberación controlada o sostenida del producto que, por tanto, puede administrarse por medio de una inyección de liberación lenta. En ciertas realizaciones, también puede usarse ácido hialurónico y esto puede tener el efecto de estimular la duración sostenida en la circulación. En ciertas realizaciones, se pueden usar dispositivos implantables de 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-1 R1 se formulan en forma de polvo seco para inhalación. En realizaciones preferidas pueden formularse soluciones para inhalación de anticuerpo anti-IL-1 R1 con un agente propelente para la liberación de aerosol. En ciertas realizaciones, pueden nebulizarse soluciones. Se describe además la administración pulmonar y los procedimientos de formulación se describen además en la publicación de patente internacional n W094/20069, que describe la liberación de proteínas químicamente modificadas.

65

También se contempla que ciertas formulaciones pueden administrarse por vía oral. Se pueden formular anticuerpos Anti-IL-1 R1 que se administran de este modo con o sin los vehículos usados normalmente en la composición de formas de dosificación sólida, tales como comprimidos y cápsulas. En ciertas realizaciones, una cápsula para liberar la parte activa de la formulación en el punto del tracto gastrointestinal donde se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación presistémica. Pueden incluirse agentes adicionales para facilitar la absorción del anticuerpo anti-IL-1 R1. También pueden emplearse diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes de disgregación de comprimidos y aglutinantes.

Una composición farmacéutica de la invención se proporciona, preferentemente, para comprender una cantidad eficaz de uno de una pluralidad de anticuerpos anti-IL-1 R1 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. Los excipientes adecuados incluyen, entre otros, 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 arábica; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Las composiciones farmacéuticas adicionales serán evidentes para los expertos en la técnica, incluyendo formulaciones que implican moléculas de anticuerpos anti-IL-1 R1 en formulaciones de liberación sostenida o controlada. Los expertos en la técnica conocen también técnicas para formular una variedad de otros medios de liberación sostenida o controlada, tales como vehículos de liposoma, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de liberación lenta. Véase por ejemplo, la publicación de patente internacional nº WO93/15722,

que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la liberación de composiciones farmacéuticas. Preparaciones de liberación sostenida pueden incluir matrices de polímero semipermeables en forma de artículos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, poliláctidos (como se divulga en la patente de EE.UU. 3,773,919 y la publicación de solicitud de patente europea nº EP 058481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato [Sidman y col, Biopolymers, 22:547-556 (1983)], poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) [Langer y col, J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277, y Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), etilenvinilacetato (Langer et al., supra) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (publicación de solicitud de patente europea Nº EP 133,988). Las composiciones de liberación sostenida también incluyen liposomas, que pueden prepararse mediante cualquiera de varios procedimientos conocidos en la técnica. Véase por ejemplo, Eppstein y 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692; publicación de solicitud de patente europea nº EP 036,676; EP 088,046 y EP 143,949.

Las composiciones farmacéuticas usadas para administración in vivo normalmente se proporcionan como preparaciones estériles. La esterilización puede realizarse mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición está liofilizada, la esterilización usando este procedimiento puede realizarse o bien antes de o bien tras la liofilización y reconstitución. Las composiciones para la administración parenteral pueden conservarse en forma liofilizada o en solución. 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, puede almacenarse en viales estériles como solución, 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 (por ejemplo, liofilizada) que requiere la reconstitución antes de la administración.

La invención también proporciona kit 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 ciertas realizaciones de la presente invención se proporcionan kits pueden contener jeringas precargadas de una única cámara o múltiples cámaras (por ejemplo, jeringas de líquidos y liojeringas).

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

La frecuencia de la dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos del anticuerpo anti-IL-1 R1 concreto en la formulación usada. 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) en el tiempo o como infusión continua mediante un dispositivo de implantación o catéter. El perfeccionamiento adicional de la dosis adecuada 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 es según los procedimientos conocidos, por ejemplo por vía oral, a través de inyección por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimatoso), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal, intralesional, mediante sistemas de liberación sostenida o mediante dispositivos de implantación. En ciertas realizaciones, las composiciones pueden administrarse mediante inyección en bolo o de manera continua mediante infusión, o mediante dispositivo de implantación.

La composición 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 ciertas realizaciones, cuando se usa 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 usar composiciones farmacéuticas con el anticuerpo anti-IL-1 R1 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 concreto, los anticuerpos anti-IL-1 R1 pueden liberarse mediante la implantación de ciertas células que se han modificado mediante ingeniería genética, usando procedimientos tales como los descritos en el presente documento, para expresar y secretar el polipéptido. En ciertas realizaciones, tales células pueden ser células animales o humanas, y pueden ser autólogas, heterólogas o xenogénicas. En ciertas 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, normalmente, membranas o envolturas poliméricas, semipermeables, biocompatibles que permiten la liberación del (de los) producto(s) 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 ciertas realizaciones, la invención abarca además la administración de un anticuerpo anti-IL-1 R1 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 pretratamiento, tratamiento simultáneo, tratamiento secuencial y regímenes alternativos. Ejemplos de dichos fármacos incluyen, entre otros, antivirales, antibióticos, analgésicos, corticosteroides, antagonistas de citocinas inflamatorias, fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD) y antiinflamatorios no esteroideos.

En otras realizaciones, un anticuerpo anti-IL-1 R1 o composición farmacéutica de la invención se puede administrar en combinación con otros inhibidores de citocinas, incluidos los antagonistas, por ejemplo RANKL, TGF-3, IFN γ , IL-6 o IL-8 y TNF, particularmente TNF α . En combinación con IL-6, un anticuerpo de la presente invención se puede usar para tratar y prevenir la recurrencia de convulsiones, incluidas las convulsiones inducidas por antagonismo del receptor del GABA, las convulsiones asociadas con episodios de ictus en EEG y convulsiones límbicas motoras que se producen durante el estado epiléptico. En combinación con el inhibidor del IFN γ , un anticuerpo de la presente invención es útil en el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática y la fibrosis quística. La combinación de un anticuerpo del receptor de IL1 e inhibidores de RANKL, por ejemplo anticuerpo RANKL es útil para prevenir la destrucción ósea en varios contextos, incluidos, entre otros, varios trastornos reumáticos, osteoporosis, mieloma múltiple u otras neoplasias malignas que producen 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 la 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 IL-17R, proteína de unión a la IL-18, formas solubles de los receptores IL-18 y anticuerpos frente a IL-18, anticuerpos frente a los receptores de IL-18 o anticuerpos contra el ligando-CD30 o contra CD4.

La invención abarca además procedimientos para usar un anticuerpo anti-IL1 R1 o composición farmacéutica de la invención en el tratamiento de trastornos médicos divulgados en el presente documento en combinación con un inhibidor de TNF, preferentemente TNFR: Fc (ENBREL®) y cualquier combinación de las citocinas descritas o inhibidores de citocinas que son agentes activos en terapias de combinación. Por ejemplo, de acuerdo con la presente invención, los procedimientos de terapia de combinación se pueden usar para tratar artritis reumatoide,

ictus, asma, psoriasis, etc.

Las afecciones tratadas de forma eficaz con un anticuerpo anti-IL-1 R1 o composición farmacéutica descrita en el presente documento 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 SDRA, todas ellas se pueden tratar con combinaciones de un anticuerpo frente a IL-1 R y un inhibidor de IL-4 y/o un inhibidor de IL-13, por ejemplo un anticuerpo frente a IL-4R que inhibe la actividad de IL-13 e IL-4. Los anticuerpos divulgados y las composiciones farmacéuticas de la invención también son útiles para tratar la displasia broncopulmonar (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 usan 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 divulgados se usan para tratar la neumonía de organización bronquiolitérica, 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 varios trastornos cutáneos, incluidos, entre otros, dermatitis herpetiforme (enfermedad de Duhring), dermatitis atópica, dermatitis de contacto, urticaria (incluida la urticaria idiopática crónica) y enfermedades ampollosas autoinmunitarias, incluidos el pénfigo vulgar y el penfigoide ampolloso. 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 gravis, 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 frente al receptor de IL-1 y las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento 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 enfermedades y lesiones cardiovasculares son tratables y/o prevenibles con las composiciones farmacéuticas divulgadas o anticuerpos anti-IL1 -R1 solos o en combinación con otros inhibidores de las citocinas. Los 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, 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 cardíaca o tras procedimientos angioplásticos con globo de la arteria carótida, isquemia miocárdica silente, disfunción de la bomba ventricular izquierda, complicaciones postimplantación de los dispositivos de ayuda del ventrículo izquierdo, fenómeno de Raynaud, tromboflebitis, vasculitis, vasculitis de Kawasaki, enfermedad venooclusiva, arteritis de células gigantes, granulomatosis de Wegener, confusión mental tras cirugía de derivación cardiopulmonar y púrpura de Schoenlein-Henoch.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-IL-1 R1 y las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden usar 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-1 R1 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 tratamientos 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-1 R1 o composiciones farmacéuticas de la invención, solos o en combinación con otras terapéuticas. 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 genitourinaria también se pueden tratar o prevenir con anticuerpos anti-IL-1 R1 o composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. Dichos trastornos incluyen glomerulonefritis,

incluyendo glomerulonefritis autoinmunitaria, 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 anti-IL-1 R1, solos o en combinación con otros inhibidores de citocinas u otros agentes activos, como se ha descrito anteriormente, se pueden usar para tratar varias 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 SNCLC), incluyendo caquexia asociada con cáncer, fatiga, astenia, síndrome paraneoplásico de caquexia e hipercalcemia. Los tumores sólidos, incluyendo sarcoma, osteosarcoma, y carcinoma, tal como adenocarcinoma (por ejemplo cáncer de mama) y carcinoma de células escamosas también se pueden tratar. Otros cánceres tratables incluyen cáncer de esófago, gástrico, carcinoma de vesícula biliar, leucemia, incluidas leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia mieloide, 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.

En el presente documento también se proporcionan procedimientos para usar anticuerpos anti-IL-1 R1 de la invención, composiciones y terapias de combinación para tratar varios trastornos hematológicos y oncológicos. Por ejemplo, los anticuerpos anti-IL-1 R1, solos o en combinación con otros inhibidores de citocinas u otros agentes activos, como se ha descrito anteriormente, se pueden usar para tratar varias 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 SNCLC), incluyendo caquexia asociada con cáncer, fatiga, astenia, síndrome paraneoplásico de caquexia e hipercalcemia. Los tumores sólidos, incluyendo sarcoma, osteosarcoma, y carcinoma, tal como adenocarcinoma (por ejemplo cáncer de mama) y carcinoma de células escamosas también se pueden tratar. Otros cánceres tratables incluyen cáncer de esófago, gástrico, carcinoma de vesícula biliar, leucemia, incluidas leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia mieloide, 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 divulgados se pueden usar 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 (incluidos anemia refractaria, anemia refractaria con sideroblastos en anillo, anemia refractaria con exceso de blastos, anemia refractaria con exceso de blastos en transformación), mielofibrosis/ metaplasia mieloide y crisis vasooclusiva de drepanocitos.

Varios trastornos linfoproliferativos también se pueden tratar con anticuerpos anti-IL-1 R1 de la invención, incluidos síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (SLPA), leucemia linfoblástica crónica, leucemia de células peludas, leucemia linfática crónica, linfoma de células T periféricas, linfoma linfocítica pequeña, 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 Sezary.

Las 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 anti receptor de IL-1 divulgados o las composiciones farmacéuticas incluyen las resultantes 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 cerebral.

Los anticuerpos Anti-IL-1 R1 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-1 R1 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-1 R1 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.

Los trastornos no artríticos de los huesos y las articulaciones también se pueden tratar con los anticuerpos descritos en el presente documento. Esto abarca trastornos de los osteoclastos que conducen a la pérdida de hueso, tales como, entre otros, 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).

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

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 varias afecciones, incluyendo la
15 enfermedad de Alzheimer, amiloidosis reactiva secundaria, síndrome de Down y amiloidosis asociada con diálisis. También se pueden tratar con los anticuerpos y las composiciones farmacéuticas de la invención son 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).

20 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. Otros trastornos de piel que se pueden tratar usando los anticuerpos de la invención incluyen acné, acné rosáceo, alopecia areata, estomatitis aftosa, penfigoide
25 ampuloso, quemaduras, eccema, eritema, incluido eritema multiforme y eritema multiforme ampuloso (síndrome de Stevens-Johnson), enfermedad cutánea inflamatoria, liquen plano, enfermedad ampulosa por IgA lineal (dermatosis ampulosa 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
30 herpetiforme.

Trastornos adicionales que se pueden tratar con los anticuerpos o las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen la enfermedad del injerto contra el huésped y complicaciones resultantes de trasplantes de órganos
35 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-IL-1 R1 o las composiciones farmacéuticas divulgados, incluidos desprendimiento de retina regmatógena y enfermedad ocular inflamatoria, incluida la enfermedad ocular inflamatoria asociada con el tabaquismo y la degeneración macular.

40 Los anticuerpos o composiciones farmacéuticas de la invención, como se describe en el presente documento, 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 preeclámsicos o eclampsia, endometriosis, cervicitis crónica y parto prematuro.

45 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-1 R1 o las composiciones farmacéuticas incluyen
50 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 varios trastornos autoinmunitarios o enfermedades asociadas con deficiencias hereditarias, incluido el retraso mental ligado al cromosoma X.

Además, los anticuerpos anti-IL-1 R1 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
60 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

65 Usos adicionales para los anticuerpos o composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, entre otros, 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 gravis, isquemia cerebral silente, trastornos del sueño, incluido narcolepsia y apnea del sueño, degeneración neuronal crónica e ictus, incluidas las enfermedades
- 5 isquémicas cerebrales. Otros usos adicionales para los anticuerpos de la invención son anorexia y/o trastornos anoréxicos, peritonitis, endotoxemia y shock séptico, formación de granuloma, ictus cardíaco, síndrome de Churg-Strauss, inflamación crónica tras infecciones agudas tales como tuberculosis y lepra, esclerosis sistémica y cicatrización hipertrófica.
- 10 En otras realizaciones, las proteínas de fusión con avidina que comprenden una secuencia de aminoácidos de uno de los anticuerpos IL-1 R1 de la invención se pueden construir para varios fines. Las proteínas de fusión con avidina se pueden generar usando, por ejemplo, un vector de expresión en mamíferos que contienen la secuencia de ADNc que codifica la avidina de pollo recombinante adyacente a un sitio de clonación múltiple para inserción de una pareja
- 15 de fusión génica diana específica. El vector puede incluir una secuencia de avidina con su secuencia señal endógena para permitir la secreción de parejas génicas de fusión pequeñas 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 porción N de la pareja de fusión. La estrategia de fusión como se ha descrito en el presente documento tiene la capacidad de secretar proteínas que se expresan normalmente intracelularmente, tal como genes de transducción de señal o receptores de hormonas nucleares.
- 20 Como alternativa, se puede usar un vector que codifica avidina sin su secuencia señal endógena, que tendrá como resultado una marca en C terminal de las parejas de proteínas de fusión. Una fusión de avidina en el extremo C permite la secreción de proteínas en base a la secuencia señal endógena de la pareja de fusión. Esta estrategia se puede aplicar para permitir el correcto procesamiento y plegamiento de la proteína o para determinar la validez de
- 25 una secuencia señal propuesta. Adicionalmente, el vector puede comprender una secuencia nucleotídica corta que codifica una secuencia de aminoácidos que puede actuar como sustrato específico escindible por enzima, entre la avidina y las secuencias de la pareja de fusión. Dichas secuencias escindibles por enzimas permiten la separación de la pareja de fusión de la avidina para la purificación o con fines de liberación de la proteína.
- 30 Las proteínas de fusión con avidina de la invención se pueden usar en por ejemplo, detección selectiva de anticuerpos, caracterización funcional (determinación de la utilidad de un anticuerpo como agonista o antagonista, agente neutralizante etc.), mapeo 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 o estándar de otro tipo
- 35 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. Las parejas de proteínas de fusión con avidina se pueden preparar como secuencias de longitud completa o truncadas, dominios estructurales aislados específicos o como secuencias quiméricas con otros homólogos de la pareja de fusión de otras especies.
- 40 Las proteínas de fusión con avidina se pueden expresar usando medios estándar de introducir genes en células, como se ha descrito en el presente documento y como se conoce en la técnica. Las proteínas se pueden expresar en, por ejemplo, células 293 o CHO transfectando las células con una construcción de la fusión de avidina en una solución de lípidos, tal como en Lipofectamina (Invitrogen, Carlsbad, CA).
- 45 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 de ELISA revestidos con biotina. La recolección del medio acondicionado y/o el lisado celular se puede realizar en un punto de tiempo que permita la expresión óptima de la proteína de fusión. Los expertos en la técnica pueden determinar experimentalmente el punto de tiempo, pero normalmente es de aproximadamente 48 horas tras la transfección. Las
- 50 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.
- 55 Las proteínas de fusión de avidina de la invención se pueden analizar mediante cualquier procedimiento conocido o previamente caracterizado que usa interacciones biotina-avidina. Dichos procedimientos incluyen, entre otros, citometría de flujo y pruebas de imagen fluorescente/microscopia. Por ejemplo, las proteínas de fusión de avidina expresadas en medios o lisados celulares se pueden aplicar a perlas recubiertas con biotina y teñir con anticuerpos anti-avidina marcados con fluorescencia para indicar el nivel de expresión. Asimismo, se pueden aplicar anticuerpos fluorescentes que reconocen la pareja de la proteína de fusión específica en un formato de ensayo multicolorimétrico. Adicionalmente, los anticuerpos no marcados específicos de la pareja de la proteína de fusión se pueden aplicar de forma simultánea con anticuerpos marcados con fluorescencia en un ensayo de competición.
- 60 En ciertas realizaciones, la invención proporciona procedimientos para mapear los epítomos usando proteínas de fusión con avidina. Más adelante se proporciona un ejemplo de un procedimiento para mapear los epítomos de la invención con respecto al mapeo de epítomos para anticuerpos anti-IL- 1R1. No obstante, un experto en la técnica reconocerá que dichos procedimientos se pueden aplicar fácilmente para mapear los epítomos para cualquier
- 65 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 epítipo) 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 usando técnicas moleculares convencionales. Un panel de proteínas mutantes marcadas con avidina-FLAG donde se han sustituido ciertos aminoácidos (p. ej., con los correspondientes residuos de aminoácidos de otras especies animales) se pueden generar usando técnicas convencionales. Las proteínas mutantes y silvestres se pueden expresar en células huésped y la unión de las proteínas mutantes y silvestres con un anticuerpo de interés se puede detectar usando, por ejemplo, análisis de transferencia Western o ensayos de unión basados en perlas, como se describe en el presente documento. Por tanto, un epítipo se puede definir determinando qué sustituciones en las proteínas mutantes destruyen la unión al anticuerpo de interés.

Ejemplos

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 presente invención.

Ejemplo 1

Producción de anticuerpos monoclonales humanos contra el receptor tipo 1 de la interleucina 1 (IL-1R1)

Ratones HuMab transgénicos

Los anticuerpos monoclonales completamente humanos frente al receptor de tipo 1 de IL-1 (IL-1R1) se prepararon usando la cepa HCo7 de ratones transgénicos, que expresan genes de anticuerpos humanos. En cada una de estas cepas de ratones, el gen endógeno de la cadena ligera kappa de ratón se ha alterado de forma homocigota como se describe en Chen et al. (1993, EMBO J. 12:811 -820) y el gen endógeno de la cadena pesada de ratón se ha alterado de forma homocigota como se describe en el Ejemplo 1 de la publicación de solicitud de patente internacional n° WO 01/09187.

Cada una de estas cepas de ratón porta un transgén de la cadena ligera kappa humana, KCo5, como se describe en Fishwild et al. (1996, Nature Biotechnology 14:845-851). La cepa HCo7 porta el transgén de la cadena pesada humana de HCo7 como se describe en las Patentes de EE.UU. N° 5.545.806; 5.625.825; y 5.545.807.

La cepa HCo7 se denomina en el presente documento ratón HuMab.

Inmunizaciones con HuMab

Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos frente al IL-1 R1 se inmunizó a los ratones HuMab con IL-1 R1 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 n° WO 98/24884.

Los ratones tenían 6-16 semanas de edad tras la primera infusión del antígeno. Una preparación recombinante purificada (25-50 µg) del antígeno IL-1 R1 (p. ej., purificada de células de insecto o de mamífero transfectadas que expresan IL-1 R1) se usó para inmunizar los ratones HuMab por vía intraperitoneal (IP) o subcutánea (SC).

Las inmunizaciones de ratones HuMab transgénicos se realizaron usando 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 antígeno. Se inmunizó un total de 149 ratones de la cepa HCo7 con IL-1 R1. La respuesta inmunitaria se monitorizó mediante sangrados retroorbitales.

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 describen Fishwild et al., supra. En resumen, placas de microtitulación se revistieron con IL-1R1 recombinante purificado de células de insecto o de mamífero a 1-2 µg/ml en PBS y 50 µl/pocillo incubadas a 4 °C durante la noche, después se bloquearon con 200 µl/pocillo de suero de pollo al 5 % en PBS/Tween (0,05 %). A cada pocillo 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 de Fc de IgG ANTI-humana de cabra conjugado con peroxidada de rábano (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/Tween y después se incubaron con reactivo policlonal específico de Fc de IgG ANTI-humana de cabra conjugado con peroxidada de rábano (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar, las placas se desarrollaron con sustrato ABTS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Catalog No. A-1888, 0,22 mg/mL) y se analizaron espectrofotométricamente a un DO de 415-495. Los ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-IL-1 R1 se usaron para producir anticuerpos monoclonales como se describe más adelante.

Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos frente a 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 ratones HuMab y se condensaron con PEG a una línea celular de mieloma de ratón usando protocolos estándar. Normalmente se realizaron 20-30 fusiones para cada antígeno.

En resumen, 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 secretor (nº de registro en la A.T.C.C., CRL 1580) o células de mieloma de ratón no secretor SP2/0 (A.T.C.C., CRL 1581) con 50 % de PEG (Sigma). Las células se sembraron a aproximadamente 1×10^5 / pocillo en placas de microtitulación de fondo plano, seguido de aproximadamente una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene 10 % de suero bovino fetal, 10 % de medio condicionado P388D1 (nº de registro en la A.T.C.C., CRLTIB-63), 3-5 % origen (IGEN) en DMEM (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 donde HAT se había sustituido por HT.

Los hibridomas resultantes se sometieron a detección selectiva para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Los pocillos individuales se sometieron a detección selectiva mediante ELISA (descrito anteriormente) para anticuerpos IgG monoclonales anti-IL-1 R1 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 detección selectiva y, si siguen siendo positivos para IgG humana, los anticuerpos monoclonales anti-IL-1 R1 se subclonaron al menos dos veces mediante dilución límite. Los subclones estables se cultivaron después *in Vitro* para generar cantidades pequeñas de anticuerpo en medio de cultivo tisular para caracterizar.

Selección de anticuerpos monoclonales anti-IL-1 R1 humanos

Para la detección selectiva de hibridomas que mostraron reactividad positiva con el inmunógeno IL-1 R1 se usó un ensayo ELISA como se ha descrito antes. Los hibridomas secretores de un anticuerpo monoclonal unido con avida elevada a IL-1R1 se subclonaron y después se caracterizaron. Un clon de cada hibridoma, que retuvo la reactividad de las células parentales (determinado por ELISA) se escogió para hacer un banco celular de 5-10 viales almacenado en nitrógeno líquido.

Se realizó un ELISA específico de isotipo para determinar el isotipo de los anticuerpos monoclonales producidos como se divulga en el presente documento. En estos experimentos, los pocillos de las placas de microtitulación se revistieron con 50 µl/pocillo de una solución de 1 µg/ml de la cadena ligera kappa anti-humana de ratón en PBS y se incubaron a 4 °C durante la noche. Después de bloquear con 5 % de suero de pollo, las placas reaccionaron con sobrenadante de cada anticuerpo monoclonal analizado y un isotipo control purificado. Las placas se incubaron durante a temperatura ambiente durante 1-2 horas. Después, los pocillos se hicieron reaccionar con antisuero policlonal anti-humano de cabra conjugado con peroxidada de rábano específico de IgG 1, IgG2 o IgG4 humanas y las placas se desarrollaron y analizaron como se describe más adelante.

Los anticuerpos monoclonales purificados de los sobrenadantes de hibridoma que mostraron una unión significativa a IL-1R1 detectado mediante ELISA se analizaron después según su actividad biológica usando ensayos de unión *in vitro* y ensayos basados en células 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 epítomos. Las placas de ELISA se revistieron con sIL-1 R1 humano (dominio 1+2+3), sIL-1 R1 humano truncado (dominio 1+2), sIL-1 R1 de rata, sIL-1 R1 de tipo II humano y ovoalbúmina (control negativo). La unión del anticuerpo se detectó con un anticuerpo Fc anti-humano conjugado con peroxidada de rábano (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 solo se unen a la proteína IL-1 R1 que tiene los tres dominios extracelulares, lo que indica que los epítomos para cada uno entran dentro del tercer dominio. El anticuerpo 10H7 se une al dominio extracelular de longitud completa IL-1 R1 y también una proteína truncada que solo tiene los dominios 1 y 2, que demuestra 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-1 R1 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 R1 (Dominio 1+2+3)	Rata sIL-1 R1 (Dominio 1+2+3)
15C4	X	√	X	X	X

Anticuerpo	OA (Control negativo)	Hu sIL-1 R1 (Dominio 1+2+3)	Hu sIL-1 R1 (Dominio 1+2)	Hu sIL-1 R1 (Dominio 1+2+3)	Rata sIL-1 R1 (Dominio 1+2+3)
26F5	X	√	X	X	X
27F2	X	√	X	X	X
24E12	X	√	X	X	X
10H7	X	√	√	X	X

Ejemplo 2

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

5 La capacidad de los anticuerpos para inhibir los acontecimientos de unión extracelular requeridos para la señalización de IL-1 se evaluó con proteínas recombinantes *in vitro* en un ensayo donde la unión de IL-1 a IL-1 R 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-1 R (denominado "formación de complejo") se mide del siguiente modo. Las proteínas recombinantes se incubaron en ensayos de unión en placas de microtitulación en ausencia (control) o presencia de anticuerpos. Los valores de CI50 derivaron de las comparaciones de los valores control con los valores obtenidos en presencia del anticuerpo a concentraciones entre 10 fM y 1 μ M. En resumen, el ensayo se realizó del siguiente modo: IL-1R1 biotinilado y perlas recubiertas con estreptavidina (Dyna, 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 abanico de concentraciones. Se añadió IL-1 β o IL-1 α a una concentración de 1 nM y se añadió IL1 RACp marcado con rutenio (preparado con NHS-Tag (IGEN) de acuerdo con los protocolos IGEN) a una concentración final de 5 nM. Tras incubarse 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-1 RACp a IL-1 unida a IL-1 R1 se determinó detectando la señal de electroquimioluminiscencia asociada con las perlas unidas a IL-1 R1. La reducción de la señal resultante de la competición del anticuerpo de la unión de IL-1 o IL-1 RACp se calculó como un porcentaje de la señal ECL para la unión máxima (sin competición).

Se estableció la curva de respuesta de inhibición para cada anticuerpo en estos ensayos de unión y las CI50 se obtuvieron usando el software PRISM™. Los resultados de la inhibición de IL-1 (3 acontecimientos de unión inducida se representan en el gráfico en la Figura 12. Los valores de CI50 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-1 R1, 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-1 RACp 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-1 ra. Los ligandos del tercer dominio demostraron una capacidad similar o ligeramente superior para inhibir la formación del complejo mediante comparación con IL-1 ra.

La Figura 13 representa la capacidad del anticuerpo 15C4 para inhibir la formación del complejo IL-1 R1/IL-1a/RACp. La CI50 para la formación del complejo IL-1 R1/IL-1a/RACp fue 43 pM.

Tabla 3

	Anti-IL1-R1 humano					
	15C4	26F5	27F2	24E12	10H7	ril-1 ra
CI50	96 pM	160 pM	333 pM	348 pM	5.3 nM	555 pM
Límites del intervalo de confianza del 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	414pM 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-1 R1 para inhibir la IL-1 β o el IL-1 ra a IL-1 R1 se evaluó en un ensayo con proteínas recombinantes. La mezcla de reacción contenía 0,1 mg/ml de Dynabeads M-280 Streptavidin (Dyna) y IL-

1 R1 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-1 ra (1 nM) marcados con rutenio inició la unión que procedió 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-1 ra en comparación con el IgG control. En contraste, el anticuerpo 24E12 se une al receptor pero no bloquea la unión de IL-1 β o de IL-1 ra al receptor. Por 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 de IL-1 β y de IL-1 ra 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 contiene FBS al 1 % y Pen Strep al 1 % (GIBCO). Se dejó que las células se recuperaran durante la noche antes de la adición de anticuerpos anti-IL-1-R1 a concentraciones que varían de nM a 0,1 pM durante 20 minutos. Se añadió IL-1 β a una concentración de 1 pM (~CE50) 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 usando 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 anticuerpo de la invención en los ensayos basados en células y los valores de CI50 se obtuvieron usando el software PRISM™. Los anticuerpos 15C4, 26F5, y 27F2 son potentes inhibidores de la señalización de IL-1 en comparación con IL-1 ra (Figura 15A). Los anticuerpos 24E12 y 10H7 son marcadamente menos potentes que 15C4 y 27F2 (Figura 15B). Los valores de CI50 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.

Los anticuerpos monoclonales Anti-IL-1 R1 15C4, 26F5, y 27F2 se preincubaron 40-60 minutos con sangre entera humana obtenida 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 alicataron 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 (CE50). 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, el IL-1ra se preincubó 40-60 minutos con sangre entera y la producción de IL-6 se midió como se ha indicado antes. Los tres anticuerpos anti-IL-1 R1 bloquearon la actividad de IL-1 con una potencia comparable a la de IL-1 ra (Figura 16). Los valores de CI50 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			rIL-1ra
	15C4	27F2	26F5	
CI50	16 pM	32 pM	26 pM	32 pM
Límites de confianza del 95 %	15 pM a 18 pM	21 pM a 49 pM	19pM a 36pM	22 pM a 46 pM

Tabla 4B

	Anticuerpos anti-IL-1 R1 humanos				rIL-ra
	15C4	27F2	10H7	24E12	
CI50	7pM	28 pM	7,5 pM	NA	20 pM
Límites de confianza del 95 %	5,8pM a 7,9pM	22pM a 35 pM	5,6 nM a 10 nM	NA	17 pM a 23 pM

Tabla 5

Donante	Parámetros de análisis	15C4	26F5	27F2	IL-1ra
1047	CI50	126 pM	410 pM	249 pM	241 pM
	Límites de confianza del 95 %	47pM a 339 pM	213 pM a 790 pM	88 pM a 703 pM	124pM a 471 pM
1319	CI50	111 pM	174 pM	579 pM	381 pM
	Límites de confianza del 95 %	59pM a 208pM	60 pM a 501 pM	249 pM a 1,3 nM	167 pM a 875 pM
Compuesto	CI50	126 pM	372 pM	387 pM	264 pM
(Datos combinados)	Límites de confianza del 95 %	62pM a 255 pM	187 pM a 739 pM	202pM a 748 pM	134pM a 517pM

Ejemplo 5

5 **Mutagénesis y mapeo de epítomos**

- La mutagénesis dirigida a sitio (Altered Sites® In Vitro Mutagenesis System, Promega, Madison WI) de IL-1 R1 se usó para preparar un panel de proteínas mutantes ("muteínas") 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 transfectaron de forma transitoria en células CHO. Los transfectantes simulados se generaron como controles negativos. El medio acondicionado (CM) de estas células se concentró por 20 usando las columnas de concentración Centriprep 10 (Amicon) La expresión de las luteínas 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-1 R 15C4, 27F2, o 24E12 a 0,5 ug/mL e 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 anticuerpo se identificaron como aquellas secuencias 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 de los mutantes 1, 2 y 4 se alteró (Figura 18, panel central). 27F2 no tuvo ninguna unión significativa a los mutantes 12, 13, 14 y 15 (Figura 18, panel inferior).
- El aislamiento y caracterización de los anticuerpos anti-IL-1 R1 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 mapeo del epítomo 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 epítomo conformacional solapante pero no idéntico. Las Figuras 20 y 21 ilustran la posición de los epítomos de 15C4 en el tercer dominio del receptor de IL-1, en un diagrama de lazo de un receptor de IL-1 unido a IL-1 ra (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 epítomos definen sitios de unión para anticuerpos de una clase superior. Los sitios de unión de 15C4 y 27F2 son solapantes, pero no idénticos, determinado por el análisis mutacional de los 15 sitios diferentes dentro del IL-1 R1 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 a15C4 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 del IL-1 ra. 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-1 RAcP con IL-1 unida 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 IL-1 o en la unión del IL-1 ra (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 diez hibridomas que expresan los anticuerpos monoclonales de unión a all1-RI, 15C4, 27F2, y 26F5, se clonaron el vector de expresión de células de mamífero pDSR α 19 (véase la publicación de solicitud internacional n^o WO 90/14363).

La construcción del plásmido que codifica la cadena ligera kappa de 15C4 se describe explícitamente en el presente documento; la clonación de la otra especie de cadena ligera se realizó usando procedimientos similares. La región variable de la cadena ligera kappa de α IL-1 R1 15C4 se obtuvo usando amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la primera hebra del ADNc preparado del ARN total del hibridoma all_1-RI de 15C4 preparado usando el reactivo TRizol® (Invitrogen). La primera hebra 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 fue el cebador anidado GeneRacer™ (5' GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA -3'; SEQ ID NO 45) y el cebador inverso fue 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 completo. 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 CTT 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 el sitio de restricción SaI (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-1 R1 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 (SEC ID N^o:49)

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

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

SaII * C E G R N F S (SEC ID N^o:50)

El clon de la cadena kappa de longitud completa de α IL-1 R1 15C4 se obtuvo usando el clon pCR4:15C4 cadena kappa mediante amplificación con PCR con los cebadores de la cadena kappa de 15C4 de α IL-1 R1 5' y 3'. La reacción de PCR generó un producto de 733 pares de bases que codifican 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 IL-1 R1 15C4. El producto de la amplificación con PCR se purificaron usando un kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen N^o de catálogo 28104), se cortó con XbaI y SaI, se aisló en gel y se purificó usando un kit de extracción QIAquick Gel (Qiagen n^o de catálogo 28704). Este fragmento de PCR que contiene la cadena kappa completa aE-1 R1 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 para confirmar que codificaba el mismo péptido que se identificó en el hibridoma 15C4. El vector de

expresión final, pDSR α 19:15C4 IgG1, cadena kappa, tiene 5468 pares de bases y contiene las siete regiones funcionales que se describen en la Tabla 6.

Tabla 6

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

5

Construcción de pDSR19:hlgG1CH

Se construyó un plásmido de expresión pDSR α 19:región variable de rata/región constante humana IgG1 (rVh/hCh1) MAb como resultado de una unión de tres piezas del producto de la PCR de la región variable de anticuerpos de rata terminada con XbaI y BsmB, la región constante de IgG1 humana (dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3) derivada por escisión con SaI y aislamiento en gel del fragmento de SsmBI y SaI del plásmido lineal pDSR α 19:hlgG1 CH (extremos H/nc/I 11 y SsmBI) y un pDSR α 19 linealizado con extremos XbaI y SaI (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", incorporado por referencia El vector de expresión final, pDSR α 19 9:región variable de rata/Región constante humana IgG1 (rVh/hCh1), tiene 6158 pares de bases y contiene las siete regiones funcionales que se describen en la Tabla 7.

10

15

Tabla 7

<u>Número de pares de bases del plásmido</u>	
2 a 881	Una señal de poliadenilación/terminación de la transcripción de la subunidad α de la hormona glicoproteica de la hipófisis bovina (α -FSH) (Goodwin et al., 1983, Nucleic Acids Res. 11:6873-82; Número de registro en Genbank X00004)
882 a 2027	Un minigén de dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón que contiene el promotor de DHFR endógeno de ratón, las secuencias de codificación de ADNc y las señales de poliadenilación/terminación de la transcripción (Gasser et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79:6522-6; Nunberg et al., 1980, Cell 19: 355-64; Setzer et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:5143-7; McGrogan et al., 1985, J. Biol. Chem. 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 E. coli (Número de registro en Genbank J01749)
3949 a 4292	Un promotor temprano de SV40, potenciador y origen de replicación (Takebe et al., 1988, Mol. Cell Biol. 8: 466:-72; Número de registro en Genbank J02400)

Número de pares de bases del plásmido	
4299 a 4565	Un elemento potenciador de la traducción del dominio LTR de HTLV-1 (Seiki et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80:3618-22, Número de registro en Genbank J02029)
4574 a 4730	Intrón de SV40 16S, 19S, señales de corte y empalme de donante/aceptor (Okayama y Berg, 1983. Mol. Cell Biol. 3:280-9; Número de registro en Genbank J02400)
4755 a 6158	<p>El ADNc de la cadena pesada de hVh/hCh1 , entre los sitios XbaI y SaI La secuencia de este fragmento de la cadena pesada, más adelante (SEQ ID NO 51) con las secuencias de los sitios de restricción subrayados:</p> <p>XbaI <u>TCTAG</u> ACCACCATGG ACATCAGGCT CAGCTTAGTT TTCCTGTCC TTTTCATAAA AGGTGTCCAG TGTGAGGTAG AACTGGTGGA GTCTGGGGGC GGCTTAGTAC AACCTGGAAG GTCCATGACA CTCTCCTGTG CAGCCTCGGG ATTCACCTTC AGAACCTATG GCATGGCCTG GGTCCGCCAG GCCCAACGA AGGGTCTGGA GTGGGTCTCA</p> <p>TCAATTACTG CTAGTGGTGG TACCACCTAC TATCGAGACT CCGTGAAGGG CCGCTTCACT ATTTTATAGGG ATAATGCAAA AAGTACCCTA TACCTGCAGA TGGACAGTCC GAGGTCTGAG GACACGGCCA CTTATTTCTG TACATCAATT</p> <p>BsmBI TCGGAATACT GGGGCCACGG AGTCATGGTC ACCGTCTCTA GTGCCTCCACCAAGGGCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCCTCCAAG AGCACCTCTGGGGCACAGC GGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG GTGACGGTGT CGTGGAAGTC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTC CTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAATCACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG AAAGTTGAGC CCAAACTCTG TGACAAAAC CACACATGCC CACCGTGCCC AGCACCTGAA CTCCTGGGGG GACCGTCAGT CTTCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTAC ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGACCTGAGGTC AAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTACA ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCTGCA CCAGGACTGG CTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCCAGC CCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCCGGGATG AGCTGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACA CTACAAGACC ACGCCTCCCG TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCTCT ATAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCACTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGTA</p> <p>SaI AATGATAAGT <u>CGAC</u></p>

5 El plásmido lineal pDSR1 α 9:hlgG1C_H se preparó digiriendo el plásmido pDSR19:región variable de rata/región constante humana IgG1 con las enzimas de restricción XbaI y BsmBI para eliminar la región variable de rata y purificar usando el kit de extracción QIAquick Gel Extraction kit. El plásmido lineal pDSR α 19:hlgG1CH que contiene el dominio de la región constante de IgG14 humana de 1kpb se usó para aceptar el hibridoma derivado de las regiones variables del anticuerpo anti-IL-1R1.

10 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, y 26F5, se clonaron el vector de expresión de células de mamífero pDSR α 19. 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 procedimientos similares. La región variable de la cadena pesada de α L-1 R1 15C4 se obtuvo usando procedimientos de amplificación por PCR de la primera hebra del ADNc preparado del ARN total del hibridoma α L-1 R1 de 15C4 preparado usando el reactivo TRIzol®. La primera hebra 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™. Para la cadena pesada de longitud parcial, el cebador directo fue el cebador anidado GeneRacer™ (5' GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA -3'; SEQ ID NO 45) y el cebador inverso fue 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 usó 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 y un sitio para la enzima de restricción XbaI y una secuencia Kozak optimizada (5'-CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GGG GTC AAC CGC CAT CCT CG- 3'; SEQ ID NO 53). El cebador 3' codificó el extremo carboxilo de la región variable, incluida un sitio para BsmBI en la hebra sentido natural (5'-GTG GAG GCA CTA GAG ACG GTG ACC AGG GTT CC-3'; SEQ ID NO 54).

cebador de la cadena pesada 5' α L-1 R1 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 (SEC ID N°:55)

cebador de la cadena pesada de 3' α L-1 R1 15C4 (SEQ ID NO 54):

5'- GTG GAG GCA CTA GAG ACG GTG ACC AGG GTT CC-3'
 T S A S S V T V L T G (SEC ID N°:56)
BsmBI

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

El clon de la cadena pesada de longitud completa de α L-1 R1 15C4 se obtuvo del clon pCR4:15C4 cadena pesada mediante amplificación con PCR con los cebadores de la cadena pesada de 15C4 de α L-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 α L-1 R1 15C4. El producto de la PCR se purificó usando un kit de purificación QIAquick PCR y después se digirió con XbaI y SsmBI, 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 α L-1 R1 15C4 completa se ligó después en el vector de expresión en mamíferos pDSR α 19:hlgG1CH. El clon de expresión de IgG1 cadena pesada de 15C4 se secuenció su ADN para conformar que codificada 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 IgG1, cadena pesada, tenía 6173 pares de bases y contenía las siete regiones funcionales que se describen en la Tabla 8.

Tabla 8

Número de pares de bases del plásmido	
2 a 881	Una señal de poliadenilación/terminación de la transcripción de la subunidad α de la hormona glicoproteica de la hipófisis bovina (α -FSH) (Goodwin et al., 1983, Nucleic Acids Res. 11:6873-82; Número de registro en Genbank X00004)
882 a 2027	Un minigén de dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón que contiene el promotor de DHFR endógeno de ratón, las secuencias de codificación de ADNc y las señales de poliadenilación/terminación de la transcripción (Gasser et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79:6522-6; Nunberg et al., 1980, Cell 19: 355-64; Setzer et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:5143-7; McGrogan et al., 1985, J. Biol. Chem. 260: 2307-14)

Número de pares de bases del plásmido	
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 registro en Genbank J01749)
3949 a 4292	Un promotor temprano de SV40, potenciador y origen de replicación (Takebe et al., 1988, Mol. Cell Biol. 8: 466:-72; Número de registro en Genbank J02400)
4299 a 4565	Un elemento potenciador de la traducción del dominio LTR de HTLV-1 (Seiki et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80:3618-22, Número de registro en Genbank J02029)
4574 a 4730	Intrón de SV40 16S, 19S, señales de corte y empalme de donante/aceptor (Okayama y Berg, 1983. Mol. Cell Biol. 3:280-9; Número de registro en Genbank J02400)
4755 a 6173	El ADNc de IgG1, cadena pesada de 15C4, entre los sitios XbaI y SaI

Construcción de pDSR19:hlgG2C_{H1}

- 5 Se construyó un plásmido de expresión pDSR1 α 9:región variable humana/región constante humana IgG2 ((hVh/hCh2) Mab como resultado de una unión de tres piezas del producto de PCR de la región variable del anticuerpo humano digerido con XbaI y BsmBI, un gel aisló la región constante de IgG2 humana digerida con BsmBI y BsmB (dominios C_{H1}, bisagra, C_{H2} y C_{H3}) y un producto pDSR α 19 linealizado. 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 e5 5 de abril de 2002, "Human Anti-OPGL Neutralizing Antibodies As Selective OPGL Pathway Inhibitors"), tienen 6164 pares de bases y contiene las 7 regiones funcionales descritas en la tabla 9.

Tabla 9

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

Número de pares de bases del plásmido	
	<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 CAGAGACAATGCCAAGAACT CCTTGTTTCT TCAAATGAAC AGCCTGAGCG CCGAGGACATGGCTGTGTAT TACTGTACAA GAAGAACTG</p> <p style="text-align: right;"><i>BsmBI</i></p> <p>GGGACAATTT GACTACTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCTAGTG CCTCCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCC TGGCGCCCTG CTCCAGGAGC ACCTCCGAGA GCACAGCGGCCCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG ACGGTGTCGTGGAACCTCAGG CGCTCTGACC AGCGCGTGC ACACCTTCCC AGCTGTCTACAGTCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACCG TGCCCTCCAGCAACTTCGGC ACCCAGACCT ACACCTGCAA CGTAGATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGACA GTTGAGCGCA AATGTTGTGT CGAGTGCCCACCGTGCCCAG CACCACCTGT GGCAGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCCAAACCCAAG GACACCCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACGTGCGTGGTGGTGA CGTGAGCCAC GAAGACCCCG AGGTCCAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAAGCCAC GGGAGGAGCAGTTCAACAGC ACGTTCCGTG TGGTCAGCGT CCTCACCGTT GTGCACCAGGACTGGCTGAA CGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCAA CAAAGGCCTCCCAGCCCCCA TCGAGAAAAAC CATCTCCAAA ACCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCCG GGAGGAGATG ACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTACCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACACCTCCATGCTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AAGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCAG</p> <p style="text-align: right;"><i>Sall</i></p> <p>AAGAGCCTCT CCTGTCTCCGGGTAAATGA TAAGTCGAC</p>

5 El plásmido lineal pDSR α 19:hlgG4CH se preparó digiriendo el plásmido pDSR19:región variable humana/región constante humana IgG2 con las enzimas de restricción XbaI y BsmBI para eliminar la región variable humana y purificar usando el kit de extracción QIAquick Gel Extraction kit. El plásmido lineal pDSR α 19:hlgG2CH que contiene el dominio de la región constante de IgG2 humana de 1kpb se usó para aceptar el hibridoma derivado de las regiones variables del anticuerpo anti-IL-1R1.

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

El fragmento de la región variable de la cadena pesada de α L-1 R1 15C4, descrito anteriormente, se ligó en el vector de expresión en mamíferos pDSR α 19:hlgG2CH. El clon de expresión de IgG2 cadena pesada de 15C4 se secuenció su ADN para confirmar 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, pDSR α 19:15C4 IgG2, cadena pesada, tenía 6161 pares de bases y contenía 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 poliadenilación/terminación de la transcripción de la subunidad α de la hormona glicoproteica de la hipófisis bovina (α -FSH) (Goodwin et al., 1983, Nucleic Acids Res. 11:6873-82; Número de registro en Genbank X00004)

Número de pares de bases del plásmido	
882 a 2027	Un minigén de dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón que contiene el promotor de DHFR endógeno de ratón, las secuencias de codificación de ADNc y las señales de poliadenilación/terminación de la transcripción (Gasser et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79:6522-6; Nunberg et al., 1980, Cell 19: 355-64; Setzer et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:5143-7; McGrogan et al., 1985, J. Biol. Chem. 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 E. coli (Número de registro en Genbank J01749)
3949 a 4292	Un promotor temprano de SV40, potenciador y origen de replicación (Takebe et al., 1988, Mol. Cell Biol. 8: 466:-72; Número de registro en Genbank J02400)
4299 a 4565	Un elemento potenciador de la traducción del dominio LTR de HTLV-1 (Seiki et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80:3618-22, Número de registro en Genbank J02029)
4574 a 4730	Intrón de SV40 16S, 19S, señales de corte y empalme de donante/aceptor (Okayama y Berg, 1983. Mol. Cell Biol. 3:2809; Número de registro en Genbank J02400)
4755 a 6161	El ADNc de la cadena pesada 15C4 de IgG2 entre los sitios XbaI y SaI

Construcción de pDSR19:hlgG4CH

- 5 Se construyó un plásmido de expresión pDSR α 19:región variable humana/región constante humana IgG4 ((hVh/hCh4) Mab como resultado de una unión de tres piezas del producto de PCR de la región variable del anticuerpo humano digerido con XbaI y BsmBI, un gel aisló la región constante de IgG4 humana digerida con BsmBI y Sail (dominios CH2, bisagra, CH2 y CH3) y un pDSR α 19 linealizado. 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 nº 60/370,407, presentada e5 5 de abril de 2002, "Human Anti-OPGL Neutralizing Antibodies As Selective OPGL Pathway Inhibitors"), tienen 6167 pares de bases y contiene las 7 regiones funcionales descritas en la tabla 11.
- 10

Tabla 11

Número de pares de bases del plásmido	
2 a 881	Una señal de poliadenilación/terminación de la transcripción de la subunidad α de la hormona glicoproteica de la hipófisis bovina (α -FSH) (Goodwin et al., 1983, Nucleic Acids Res. 11:6873-82; Número de registro en Genbank X00004)
882 a 2027	Un minigén de dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón que contiene el promotor de DHFR endógeno de ratón, las secuencias de codificación de ADNc y las señales de poliadenilación/terminación de la transcripción (Gasser et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79:6522-6; Nunberg et al., 1980, Cell 19: 355-64; Setzer et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:5143-7; McGrogan et al., 1985, J. Biol. Chem. 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 E. coli (Número de registro en Genbank J01749)
3949 a 4292	Un promotor temprano de SV40, potenciador y origen de replicación (Takebe et al., 1988, Mol. Cell Biol. 8: 466:-72; Número de registro en Genbank J02400)
4299 a 4565	Un elemento potenciador de la traducción del dominio LTR de HTLV-1 (Seiki et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80:3618-22, Número de registro en Genbank J02029)
4574 a 4730	Intrón de SV40 16S, 19S, señales de corte y empalme de donante/aceptor (Okayama y Berg, 1983. Mol. Cell Biol. 3:2809; Número de registro en Genbank J02400)

Número de pares de bases del plásmido	
4755 a 6167	<p>El ADNc de la cadena pesada de hVh/hCh4 , entre los sitios XbaI y SaI La secuencia de este fragmento de la cadena pesada, más adelante (SEQ ID NO 58) con los sitios de restricción subrayados:</p> <p><i>XbaI</i> TCT AGACCACCAT GGACATGAGG GTCCCCGCTC AGCTCCTGGG GCTCCTGCTA TTGTGGTTGA GAGGTGCCAG ATGTGAGGTC CAGCTGGTGCAGTCTGGGGG AGGCTTGGTA CATCCTGGGG GGTCCCTGAG ACTCTCCTGTGCAGGCTCTG GATTCACCTT CAGTGGCCAT GCTTTGCACT GGGTTCGCCAGGCTCCAGGA AAAGGTCTGG AGTGGGTATC AGGTATTGGT ACTCATGGTGGGACATACTA TGCAGACTCC GTGAAGGGCC GATTCACCAT CTCCAGAGACAATGCCAAGA ACTCCTTGTT TCTTCAAATG AACAGCCTGA GCGCCGAGGACATGGCTGTG TATTACTGTA CAAGAAGAAA CTGGGGACAA TTTGACTACTGGGGCCAGGG</p> <p><i>BsmBI</i> AACCCTGGTC ACCGTCCTA GTGCCAGCAC CAAGGGGCCATCCGTCTTCC</p> <p>CCCTGGCGCC CTGCTCCAGG AGCACCTCCG AGAGCACAGCCGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG GTGACGGTGTCTGGAACCTC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTCTACAGTCTC CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA CCGTGCCTCCAGCAGCTT GGCACGAAGA CCTACACCTG CAACGTAGAT CACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAG AGAGTTGAGT CCAAATATGG TCCCCATGCCCATCATGCC CAGCACCTGA GTTCTGGGG GGACCATCAG TCTTCTGTTCCTCCAAAA CCCAAGGACA CTCTCATGAT CTCCCGACC CCTGAGGTCACGTGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCAGGAAG ACCCCGAGGT CCAGTTCAACTGGTACGTGG ATGGCGTGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCAGTTC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCTC ACCGTCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAAGGCCTCCCGT CCTCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAGCCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCAGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA CCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGA CTGACGGCTC CTTCTTCTC TACAGCAGGCTAACCGTGA CAAGAGCAGG TGGCAGGAGG GGAATGTCTT CTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC</p> <p><i>SaI</i> ACACAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCTGGGT AAATGATAAG TCGAC</p>

5 El plásmido lineal pDSR α 19:hlgG4CH se preparó digiriendo el plásmido pDSR19:región variable humana/región constante humana IgG4 con las enzimas de restricción XbaI y BsmBI para eliminar la región variable humana y purificar usando el kit de extracción QIAquick Gel Extraction kit. El plásmido lineal pDSR α 19:hlgG4CH que contiene el dominio de la región constante de IgG4 humana de 1kpb se usó para aceptar el hibridoma derivado de las regiones variables del anticuerpo α IL-1R

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

15 El fragmento de la región variable de la cadena pesada de α IL-1 R1 15C4, descrito anteriormente, se ligó en el vector de expresión en mamíferos pDSR α 19:hlgG4CH. El clon de expresión de IgG4 cadena pesada de 15C4 se secuenció su ADN para confirmar 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, pDSR α 19:15C4 IgG4, cadena pesada, tenía 6164 pares de bases y contenía las siete regiones funcionales que se describen en la Tabla 12.

Tabla 12

Número de pares de bases del plásmido	
2 a 881	Una señal de poliadenilación/terminación de la transcripción de la subunidad α de la hormona glicoproteica de la hipófisis bovina (α -FSH) (Goodwin et al., 1983, Nucleic Acids Res. 11:6873-82; Número de registro en Genbank X00004)
882 a 2027	Un minigén de dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón que contiene el promotor de DHFR endógeno de ratón, las secuencias de codificación de ADNc y las señales de poliadenilación/terminación de la transcripción (Gasser et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79:6522-6; Nunberg et al., 1980, Cell 19: 355-64; Setzer et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:5143-7; McGrogan et al., 1985, J. Biol. Chem. 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 E. coli (Número de registro en Genbank J01749)
3949 a 4292	Un promotor temprano de SV40, potenciador y origen de replicación (Takebe et al., 1988, Mol. Cell Biol. 8: 466:-72; Número de registro en Genbank J02400)
4299 a 4565	Un elemento potenciador de la traducción del dominio LTR de HTLV-1 (Seiki et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80:3618-22, Número de registro en Genbank J02029)
4574 a 4730	Intrón de SV40 16S, 19S, señales de corte y empalme de donante/aceptor (Okayama y Berg, 1983. Mol. Cell Biol. 3:2809; Número de registro en Genbank J02400)
4755 a 6164	El ADNc de IgG2, cadena pesada de 15C4, entre los sitios XbaI y Sa/I

Ejemplo 7

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

Los anticuerpos anti-IL-1 R1 recombinantes se generan en células de ovario de hámster chino, específicamente CHO AM-1/D, como se divulga en la patente de EE.UU. n°: 6.210.924.

- 10 En resumen, las secuencias de ADN que codifican las cadenas pesada o ligera completas de cada anticuerpo anti-IL-1 R1 de la invención se clonan en vectores de expresión. Las células CHO AM-1/D se co-transfeccionan 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-1 R1 adecuado. Por ejemplo, para generar el anticuerpo 26F5, las células se co-transfeccionan con un vector capaz de expresar una cadena ligera completa que comprende la
- 15 secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO 38 y un vector capaz de expresar una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO 20, la SEQ ID NO 22 o la SEQ ID NO 24. Para generar el anticuerpo 27F2, las células se co-transfeccionan con un vector capaz de expresar una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO 38; y un
- 20 vector capaz de expresar una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NOID N° 26, la SEQ ID NO 28 o la SEQ ID NO 30. Para generar el anticuerpo 15C4, las células se co-transfeccionan con un vector capaz de expresar una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO 40; y un vector capaz de expresar una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NOID N° 32, la SEQ ID NO 34 o la SEQ ID NO 36. En la Tabla 13 se resumen las cadenas ligera y pesada completas para los diversos anticuerpos de IL-1 R1.
- 25 La designación ".../IgG_" describe la secuencia de la región constante del anticuerpo concreto.

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

Anticuerpo	Región variable de la cadena pesada + región constante de la cadena pesada	Cadena pesada completa
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 NO15 + SEQ ID NO 7	SEQ ID NO 35
15C4/IgG4 (aminoácido)	SEQ ID NO 16 + SEQIDNO: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 NO37
26F5/27F2 (aminoácido)	SEQ ID NO12 + SEQ ID NO 4	SEQ ID NO38
15C4 (nucleótido)	SEQ ID NO17 + SEQ ID NO 3	SEQ ID NO 39
15C4 (aminoácido)	SEQ ID NO18 + SEQ ID NO 4	SEQ ID NO 40

La expresión estable de anticuerpos anti-IL-1 R1 se consigue cotransfectando células CHO AM-1/D deficientes en dihidrofolato reductasa (DHFR) con los vectores de expresión. Las transfecciones se llevan a cabo usando técnicas estándar (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 analizan para determinar su plegamiento adecuado y la actividad neutralizante. Se seleccionan los clones hiperproductores de anticuerpos anti-IL-1 R1 adecuadamente plegados de los isotipos IgG1, IgG2, e IgG4 y los anticuerpos se purifican como se describe más adelante.

Ejemplo 8

Producción de anticuerpo anti-IL-1 R1

Los anticuerpos anti-IL-1 R1 se producen mediante expresión en una línea clonal de células CHO. Para cada ciclo de producción, las células de un solo vial se descongelan en medios de cultivo celular sin 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 cultivar durante 5-10 días, el cultivo se usa después para inocular un biorreactor de 300 l. Tras cultivar durante 5-10 días adicionales, el cultivo se usa para inocular un biorreactor de 2000 l. La producción se lleva a cabo en un biorreactor de 2000 l usando un cultivo discontinuo donde se añade un alimento nutriente que contiene componentes de medio concentrado para mantener el crecimiento celular y la viabilidad del cultivo. La producción dura aproximadamente dos semanas, durante las cuales las células producen anticuerpo anti-IL-1-R1 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, nitrógeno y oxígeno.

Al final de la producción, el caldo celular se introduce en una centrífuga 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 por 15-30. El medio acondicionado concentrado resultante se procesa mediante purificación o se congela para purificación posterior.

Ejemplo 9

5

Mapeo del epítipo usando proteínas de fusión con avidina

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 ADNc que codifican los dominios extracelulares maduros de IL-1 R1 humanos o de cinomolgos condensados 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 IL-1R1 humana-avidina se muestra en la Figura 23 (SEQ ID NO 59). La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión IL-1R1 de cinomolgos-avidina se muestra en la Figura 24 (SEQ ID NO 60). Un panel de proteínas cynoIL-1R1-FLAG-avidina donde los aminoácidos humanos se habían sustituido para los residuos correspondientes de cinomolgos 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.

Los plásmidos que codifican las proteínas mutantes y silvestres avidina-cynoIL-1 R así como la proteína avidina-huIL-1 RI-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-1 RI a estas proteínas se evaluó mediante transferencia Western y ensayos de unión con perlas usando medio acondicionado (CM) recogido de las células transfectadas.

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 al 10 %-glicina. Tras 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 tiñen con los Mab anti-huIL-1 RI. Para la detección secundaria se usó un anticuerpo IgG- Fc-H RP anti-humano de cabra (Pierce Chemical Co.) diluido a 1:15.000 en PBST. La detección de anti-FLAG se usó para normalizar la carga de proteínas. La captura de imágenes y la densitometría se realizaron usando un sistema de imágenes digital FluorChem 8000 (Alpha Innotech Corp.). Las intensidades de la señal para los Mab anti-huIL-1 RI 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 al IL-1 R1 humano-avidina-FLAG.

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 de tipo Western. Los residuos humanos críticos para la unión del anticuerpo sin aquéllos que restablecen la señal cuando se sustituyen en cyno-IL-1 R1. En general, las mutaciones 1 y 2 (ilustradas en la Figura 25), solas o en combinación, reestablecieron 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 encontró que era el cynoIL-1 R1 silvestre. Dos anticuerpos (27F2 y 19C8) se unieron de forma consistente a las proteínas mutantes, así como a cynoIL-1 R1 silvestre. Esto sugirió que el epítipo 4 (residuos Y279-V281 de cynoIL-1 R1), identificado en las proteínas parálogas de rata/humanas y que no variaba en cynoIL-1 R1 de cinomolgo era el epítipo dominante para estos anticuerpos. El epítipo 4 está en negrita 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 combinaron en PBST y se alicuotaron en los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo con filtro (Millipore Corp.). Los anticuerpos (anti-huIL-1 RI o anti-FLAG MAb) se añadieron a 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 e IgG ((Fab')₂ anti-humana se usó para detectar la unión del anticuerpo. Tras 1 hora de incubación, las perlas se lavaron y resuspendieron en PBST. Las intensidades medias de fluorescencia (IMF) se midieron usando un Luminex 100 (Luminex Corp). Los datos se normalizaron usando los valores de IMF para la unión de Mab Anti-FLAG para representar la variación en la carga proteica. La unión del anticuerpo se expresó como un porcentaje de la unión al IL-1 R1 humano-avidina-FLAG (Figura 26). El patrón de unión de los anticuerpos anti-IL-1 R1 a las proteínas avidina-cinoIL-1 R1 -FLAG mutadas con residuos humanos, así como las proteínas de IL-1 R1 silvestres humanas y de cinomolgos fue consistente con el análisis de inmunotransferencia en la Figura 25.

Se divulga que:

60

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

65

- 5 2. Un anticuerpo humano aislado que se une específicamente al receptor de tipo 1 de la IL-1 (IL-1R1), que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO 12 o la SEQ ID NO 18, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de los mismos.
- 10 3. Un anticuerpo humano aislado que se une específicamente al receptor de tipo 1 de la IL-1 (IL-1R1), que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO 22, la SEQ ID NO 24, la SEQ ID NO 26, la SEQ ID NO 28, la SEQ ID NO 30, la SEQ ID NO 32, la SEQ ID NO 34 o la SEQ ID NO 36, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de los mismos.
- 15 4. Un anticuerpo humano aislado que se une específicamente al receptor de tipo 1 de la IL-1 (IL-1R1), que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 38 o la SEQ ID NO 40, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de los mismos.
- 20 5. Un anticuerpo humano aislado que se une específicamente al receptor de tipo 1 de la interleucina 1 (IL-1R1), donde el anticuerpo comprende: a una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID NO 10, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos, y una cadena ligera que tiene una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO 12, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos, b. una cadena ligera que tiene una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO 14, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos, y una cadena ligera que tiene una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO 12, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos o c. una cadena ligera que tiene una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO 16, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos, y una cadena ligera que tiene una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO 18, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.
- 30 6. El anticuerpo de la cláusula 5, donde la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO 10, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos, y la cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO 12, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.
- 35 7. El anticuerpo de la cláusula 6, donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO 10, y donde la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO 12, y donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de tipo 1 de la interleucina-1(IL-1R1).
- 40 8. El anticuerpo de la cláusula 5, donde la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO 14, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos, y la cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO 12, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.
- 45 9. El anticuerpo de la cláusula 8, donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO 14, y donde la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO 12, donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de tipo 1 de la interleucina-1(IL-1R1).
- 50 10. El anticuerpo de la cláusula 5, donde la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO 16, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos, y la cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que
- 55 60 65

se expone en la SEQ ID NO 18, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

5 11. El anticuerpo de la cláusula 10, donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO 16, y donde la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO 18, donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de tipo 1 de la interleucina-1(IL-1R1).

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

15 a. una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID NO 38, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma; y

20 b. una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID NO 20, la SEQ ID NO 22, la SEQ ID NO 24, SEQ ID NO 26, SEQ ID NO 28 o la SEQ ID NO 30, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

25 13. El anticuerpo de la cláusula 12, donde la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO 20, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos, y la cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO 38, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

30 14. El anticuerpo de la cláusula 13, donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO 20, y donde la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO 38, donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de tipo 1 de la interleucina-1(IL-1R1).

35 15. El anticuerpo de la cláusula 12, donde la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO 22, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos, y la cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO 38, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

45 16. El anticuerpo de la cláusula 15, donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO 22, y donde la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO 38, donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de tipo 1 de la interleucina-1(IL-1R1).

50 17. El anticuerpo de la cláusula 12, donde la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO 24, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos, y la cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO 38, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

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

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

se expone en la SEQ ID NO 38, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

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

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

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

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

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

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

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

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

45 26. El anticuerpo de la cláusula 25, donde la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO 32, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos, y la cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO 40, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

50 27. El anticuerpo de la cláusula 126, donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO 32, y donde la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO 40, donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de tipo 1 de la interleucina-1(IL-1R1).

55 28. El anticuerpo de la cláusula 25, donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO 34, un fragmento del mismos de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos, y la cadena ligera comprende una secuencia de

aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO 40, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

- 5 29. El anticuerpo de la cláusula 28, donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO 34, y donde la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO 40, donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de tipo 1 de la interleucina-1(IL-1R1).
- 10 30. El anticuerpo de la cláusula 25, donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO 36, un fragmento de los mismos de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de los mismos, y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO 40, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.
- 15 31. El anticuerpo de la realización 30, donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO 36, y donde la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO 40, donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de tipo 1 de la interleucina-1(IL-1R1).
- 20 32. El anticuerpo de la cláusula 1, 2, 3, 4, 5, 12, o 25, donde la cadena pesada y la cadena ligera están conectadas por un ligador flexible para formar un anticuerpo de una cadena.
- 25 33. El anticuerpo de acuerdo con la cláusula 32, que es un anticuerpo Fv de una sola cadena.
- 30 34. El anticuerpo de la cláusula 1, 2, 3, 4, 5, 12, o 25, que es un fragmento de anticuerpo Fab.
- 35 35. El anticuerpo de la cláusula 1, 2, 3, 4, 5, 12, o 25, que es un fragmento de anticuerpo Fab'.
36. El anticuerpo de la cláusula 1, 2, 3, 4, 5, 12, o 25, que es un fragmento de anticuerpo (Fab') 2.
37. El anticuerpo de la cláusula 1, 2, 3, 4, 5, 12, 12, o 25, donde el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano.
- 40 38. El anticuerpo de la cláusula 1, 2, 3, 4, 5, 12, o 25, donde el anticuerpo inhibe la unión de IL-1 a su receptor.
- 45 39. Un método de tratamiento de 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.
- 50 40. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la realización 38.
- 55 41. Un método de tratamiento de una enfermedad mediada por IL-1 en un paciente, que comprende administrar a un paciente la composición farmacéutica de la realización 40.
- 60 42. Una cadena pesada que comprende una región variable y una región constante, donde la región variable comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO 10, la SEQ ID NO 14 o la SEQ ID NO 16, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de los mismos.
- 65 43. Una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO 20, la SEQ ID NO 22, la SEQ ID NO 24, la SEQ ID NO 26, la SEQ ID NO 28, la SEQ ID NO 30, la SEQ ID NO 32, la SEQ ID NO 34 o la SEQ ID NO 36, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de los mismos.
44. Una cadena ligera que comprende una región variable y una región constante, donde la región variable comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO 12 o la SEQ ID NO 18, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de los mismos.
45. Una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO 38 o la SEQ ID NO 40, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de los mismos.

46. Un anticuerpo humano aislado que comprende:

- a. regiones marco de cadena pesada humana, una región CDR1 de cadena pesada humana, una región CDR2 de cadena pesada humana y una región CDR3 de cadena pesada humana, donde la región CDR3 de cadena pesada humana tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 67, la SEQ ID NO 68 o la SEQ ID NO 69; y
- b. regiones marco de cadena ligera humana, una región CDR1 de cadena ligera humana, una región CDR2 de cadena ligera humana y una región CDR3 de cadena ligera humana, donde la región CDR3 de cadena ligera humana tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 74 o la SEQ ID NO 75, donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de tipo 1 de la interleucina-1(IL-1R1).

47. El anticuerpo humano aislado de la cláusula 46, donde la región CDR2 de la cadena pesada humana tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 64, la SEQ ID NO 65 o la SEQ ID NO 66 y la región CDR2 de la cadena ligera humana tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 72 o la SEQ ID NO 73.

48. El anticuerpo humano aislado de la cláusula 46, donde la región CDR1 de la cadena pesada humana tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 61, la SEQ ID NO 62 o la SEQ ID NO 63 y la región CDR1 de la cadena ligera humana tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 70 o la SEQ ID NO 71.

49. Un anticuerpo humano aislado que comprende una región CDR1 de la cadena pesada humana, donde la CDR1 de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 61, la SEQ ID NO 62 o la SEQ ID NO 63, donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de tipo 1 de la interleucina-1(IL-1R1).

50. Un anticuerpo humano aislado que comprende una región CDR2 de la cadena pesada humana, donde la CDR2 de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 64, la SEQ ID NO 65 o la SEQ ID NO 66, donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de tipo 1 de la interleucina-1(IL-1R1).

51. Un anticuerpo humano aislado que comprende una región CDR3 de la cadena pesada humana, donde la CDR3 de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 67, la SEQ ID NO 68 o la SEQ ID NO 69, donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de tipo 1 de la interleucina-1(IL-1R1).

52. Un anticuerpo humano aislado que comprende una región CDR1 de la cadena ligera humana, donde la CDR1 de la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 70 o la SEQ ID NO 71, donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de tipo 1 de la interleucina-1(IL-1R1).

53. Un anticuerpo humano aislado que comprende una región CDR2 de la cadena pesada humana, donde la CDR2 de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 72 o la SEQ ID NO 73, donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de tipo 1 de la interleucina-1(IL-1R1).

54. Un anticuerpo humano aislado que comprende una región CDR3 de la cadena pesada humana, donde la CDR3 de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 74 o la SEQ ID NO 75, donde el anticuerpo se une específicamente a un receptor de tipo 1 de la interleucina-1(IL-1R1).

55. Un anticuerpo humano aislado que se une específicamente al polipéptido de la SEQ ID NO 76.

56. El anticuerpo de la cláusula 55, donde el anticuerpo se une específicamente al epítipo 4 de IL-1R1.

57. El anticuerpo de la cláusula 5, 12, o 25, que es un anticuerpo IgG2.

58. El anticuerpo de la cláusula 5, 12, o 25, que se une específicamente al polipéptido de la SEQ ID NO 76.

59. El anticuerpo de la cláusula 5, 12, o 25, que se une específicamente al epítipo 4 de IL-1R1.

60. Un método para el mapeo del epítipo de un antígeno seleccionado, que comprende:

(a) generar un conjunto de proteínas de fusión, donde cada proteína de fusión comprende

(i) avidina y

(ii) un fragmento del antígeno;

(b) seleccionar el conjunto de proteínas de fusión para la unión a una o más parejas de unión específica para el antígeno;

(c) aislar las proteínas de fusión en un medio que comprende biotina, con lo que la avidina se une a la biotina; y

(d) analizar las proteínas de fusión unidas por la pareja de unión específica o parejas para determinar los sitios de unión en el antígeno para la pareja de unión específica o parejas.

61. El método de la cláusula 60, donde las parejas de unión específica son anticuerpos.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Amgen Inc.

10

<120> Anticuerpo monoclonal anti-IL-1R humano terapéutico

<130> EP34140IIHvapu

15

<140> todavía no asignado

<141> por la presente

<150> 03 752 058.2

<151> 05-09-2003

20

<150> PCT/US2003/027978

<151> 05-09-2003

<150> US 60/408.719

<151> 06-09-2002

25

<160> 89

<170> PatentIn versión 3.0

30

<210> 1

<211> 990

<212> ADN

<213> *Homo Sapiens*

35

<400> 1

```

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacccct cctccaagag cacctctggg      60
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg      120
tggaaactcag gcgcccctgac cagcggcgtyg cacaccttcc cggctgtcct acagtccctca      180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc      240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc      300
aaatcttctg acaaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga      360
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct      420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac      540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtccctgcacc aggactggct gaatggcaag      600
gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc      660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag      720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc      780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg      840
ctggactccg acggctcctt ctctctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg      900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg      960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa      990
    
```

<210> 2
<211> 330
<212> PRT
<213> *Homo Sapiens*

5

<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

325

330

<210>3
 <211> 321
 <212> ADN

ES 2 565 189 T3

<213> *Homo Sapiens*

<400>3

5 cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctgttggtg cctgctgaat aacttctatc ccagagagggc caaagtacag 120
 tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aacacaaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaaag 300
 agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

10 <213> *Homo Sapiens*

<400> 4

15 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

<210> 5

<211> 978

<212> ADN

20 <213> *Homo Sapiens*

<400> 5

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
 agcacagcgg ccttgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg 120
 tggaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtcctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc 240

```

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc      300
aaatgtttgtg tcgagtgtccc accgtgtccc gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc      360
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc      420
gtggtggtg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc      480
gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt      540
gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc      600
aagggtctcca acaaaggcct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa aaccaaaggg      660
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggaggagat gaccaagaac      720
caggtcagcc tgacctgct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg      780
gagagcaatg ggagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac      840
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac      900
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc      960
tcctgtctc 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
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20
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
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
    
```

10

ES 2 565 189 T3

				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 ctggcgccct gctccaggag cacctccgag	60
agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg	120
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca	180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc	240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc	300
aaatatggtc ccccatgccc atcatgccc gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc	360
ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg	420
tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat	480
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac	540
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag	600
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	660
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat cccaggagga gatgaccaag	720
aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag	780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc	840

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

<210> 8
<211> 327
<212> PRT
<213> *Homo Sapiens*
<400> 8

5

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

10

ES 2 565 189 T3

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

5 <210> 9
 <211> 417
 <212> ADN
 <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 agcacggctt 360
 10 ttcgactggc tattatttga gttctggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctagt 417

15 <210> 10
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

<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

20

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135

5 <210> 11
 <211> 384
 <212> ADN
 <213> *Homo Sapiens*
 <400> 11

atggaagccc cagctcagct tctcttcttc 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
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggctccgct cactttcggc 360
 ggagggacca aggtggagat caaa 384

15 <210> 12
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*
 <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

20 <210> 13
 <211> 417
 <212> ADN
 <213> *Homo Sapiens*
 25 <400> 13

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
 tgtgcagtggt ctggattcac cttcagtaac tatggcatgc actgggtccg ccagggtcca 180
 ggcaaggggc tggagtgggt ggcagctata tggaatgatg gagaaaataa acaccatgca 240
 ggctccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag 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

ES 2 565 189 T3

atgggggtcaa cgcctatcct cgcctcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgag 60
 gtgcagctga tgcagtctgg agcagagggtg aaaaagcccg gggagtctct gaagatctcc 120
 tgtaaggggt ctggatacag ctttccttc cactggatcg cctgggtgcg ccagatgccc 180
 gggaaaggcc tggagtggat ggggatcatc catcctgggt cctctgatac cagatacagc 240
 ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gccgacaact ccaacagcgc cacctacctg 300
 cagtggagca gcctgaaggc ctcggacacc gccatgtatt tctgtgagag acaaagggaa 360
 ctcgactact ttgactactg gggccagggg accctgtgca ccgtctctag t 411

<210> 16
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

5

<400> 16

Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala 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
 <213> *Homo Sapiens*

15

<400> 17

ES 2 565 189 T3

```

atgtcgccat cacaactcat tgggtttctg ctgctctggg ttccagcctc caggggtgaa      60
attgtgctga ctcagtcctc agactttcag tctgtgactc caaaggagaa agtcaccatc      120
acctgccggg ccagtcagag cattggtagt agcttacact ggtaccagca gaaaccagat      180
cagtcctcaa agctcctcat caagtatgct tcccagtcct tctcaggggt cccctcgagg      240
ttcagtggca gtggatctgg gacagatttc accctcacca tcaatagcct ggaagctgaa      300
gatgtgcag cgtattactg tcatcagagt agtagtttac ctctcacttt cggcggaggg      360

accaaggtgg agatcaaa                                                    378

```

5
<210> 18
<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
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
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
Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115        120        125

```

10
15
<210> 19
<211> 1407
<212> ADN
<213> *Homo Sapiens*
<400> 19

ES 2 565 189 T3

atggagtttg	ggctgagctg	ggtcttcttc	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	ggggccgatt	caccatctcc	agagacaatt	ccaagaacac	gctgtatctg	300
caaatgaaca	gcccgagagc	cgaggacacg	gctgtgtatt	actgtgagag	agcacggctc	360
ttcgactggc	tattatttga	gttctggggc	cagggaaacc	tggtcaccgt	ctctagtgcc	420
tccaccaagg	gcccatacgg	cttccccctg	gcacctctct	ccaagagcac	ctctgggggc	480
acagcggccc	tgggctgcct	ggtcaaggac	tacttccccg	aaccggtgac	ggtgtcgtgg	540
aactcaggcg	ccctgaccag	cggcgtgcac	accttccccg	ctgtcctaca	gtcctcagga	600
ctctactccc	tcagcagcgt	ggtgaccgtg	ccctccagca	gcttgggcac	ccagacctac	660
atctgcaacg	tgaatcacia	gcccagcaac	accaaggtgg	acaagaaagt	tgagcccaaa	720
tcttgtgaca	aaactcacac	atgcccaccg	tgcccagcac	ctgaactcct	ggggggaccg	780
tcagtcttcc	tcttcccccc	aaaaccaag	gacacctca	tgatctcccg	gacctctgag	840
gtcacatgcg	tgggtggtgga	cgtgagccac	gaagaccctg	aggtaagtt	caactggtac	900
gtggacggcg	tggaggtgca	taatgccaag	acaagccgc	gggaggagca	gtacaacagc	960
acgtaccgtg	tggtcagcgt	cctcaccgtc	ctgcaccagg	actggctgaa	tggcaaggag	1020
tacaagtgca	aggctctcaa	caaagccctc	ccagccccca	tcgagaaaac	catctccaaa	1080
gccaaagggc	agccccgaga	accacaggtg	tacacctgac	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	tgacaacca	ctacacgcag	1380
aagagcctct	ccctgtctcc	gggtaaa				1407

<210> 20
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*
 <400> 20

5

ES 2 565 189 T3

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
 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*

<400> 21

atggagtttg ggctgagctg ggtcttcttc 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 ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300

5

10

caaatgaaca gcccgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agcacggtct 360
 ttcgactggc tattatttga gttctggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctagtgcc 420
 tccaccaagg gcccacggt cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 480
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540
 aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga 600
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca acttcggcac ccagacctac 660
 acctgcaacg tagatcacia gcccagcaac accaaggtgg acaagacagt tgagcgc aaa 720
 tgttgtgtcg agtgcaccacc gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttctc 780
 ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacgtgcgtg 840
 gtggtggacg tgagccacga agaccccag gtccagttca 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 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 115	Ala	Arg	Ala	Arg	Ser 120	Phe	Asp	Trp	Leu	Leu 125	Phe	Glu	Phe	
Trp	Gly 130	Gln	Gly	Thr	Leu	Val 135	Thr	Val	Ser	Ser	Ala 140	Ser	Thr	Lys	Gly	
Pro 145	Ser	Val	Phe	Pro	Leu 150	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg 155	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser 160	
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly 165	Cys	Leu	Val	Lys	Asp 170	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro 175	Val	
Thr	Val	Ser	Trp 180	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu 185	Thr	Ser	Gly	Val	His 190	Thr	Phe	
Pro	Ala	Val 195	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly 200	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser 205	Ser	Val	Val	
Thr 210	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe 215	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr 220	Thr	Cys	Asn	Val	
Asp 225	His	Lys	Pro	Ser	Asn 230	Thr	Lys	Val	Asp	Lys 235	Thr	Val	Glu	Arg	Lys 240	
Cys	Cys	Val	Glu	Cys 245	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala 250	Pro	Pro	Val	Ala	Gly 255	Pro	
Ser	Val	Phe	Leu 260	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro 265	Lys	Asp	Thr	Leu	Met 270	Ile	Ser	
Arg	Thr	Pro 275	Glu	Val	Thr	Cys	Val 280	Val	Val	Asp	Val	Ser 285	His	Glu	Asp	
Pro 290	Glu	Val	Gln	Phe	Asn 295	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val 300	Glu	Val	His	Asn	
Ala 305	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg 310	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn 315	Ser	Thr	Phe	Arg	Val 320	
Val	Ser	Val	Leu 325	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp 330	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys 335	Glu	
Tyr	Lys	Cys	Lys 340	Val	Ser	Asn	Lys	Gly 345	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile 350	Glu	Lys	
Thr	Ile	Ser 355	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln 360	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln 365	Val	Tyr	Thr	
Leu	Pro 370	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu 375	Met	Thr	Lys	Asn	Gln 380	Val	Ser	Leu	Thr	
Cys 385	Leu	Val	Lys	Gly	Phe 390	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile 395	Ala	Val	Glu	Trp	Glu 400	
Ser	Asn	Gly	Gln 405	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys 410	Thr	Thr	Pro	Pro	Met 415	Leu	
Asp	Ser	Asp	Gly 420	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr 425	Ser	Lys	Leu	Thr	Val 430	Asp	Lys	
Ser	Arg	Trp 435	Gln	Gln	Gly	Asn	Val 440	Phe	Ser	Cys	Ser	Val 445	Met	His	Glu	
Ala 450	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr 455	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser 460	Leu	Ser	Pro	Gly	

Lys
465

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

```

atggagtttg ggctgagctg ggtcttcttc 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 ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg    300
caaatgaaca gcccagagac cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag agcacggtct    360
ttcgactggc tattatattga gttctggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctagtgcc    420
agcaccaagg ggccatccgt cttccccctg gcgcccctgt ccaggagcac ctccgagagc    480
acagccgccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg    540
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtctaca gtcctcagga    600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac gaagacctac    660
acctgcaacg tagatcaca gcccagcaac accaaggtgg 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
aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc atcgagaaaa ccatctcca 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
    
```

10
 15 <210> 24
 <211> 466
 <212> PRT
 <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 ggttttcttc gtgctcttt 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 ggggcccatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag aggacgatat 360
 tttgactggt tattatttga gtattggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctagtgcc 420
 tccaccaagg gcccatcggg cttccccctg gcaccctct ccaagagcac ctctgggggc 480
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540
 aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 600
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 660
 atctgcaacg tgaatcaca gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 720
 tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 780
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 840
 gtcacatgcy tgggtgggga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 900
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 960
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1020
 tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1080

10

gccaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccc g̃gatgagctg 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> 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

				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
 <212> ADN
 <213> *Homo Sapiens*

<400> 27

atggagtttg	ggctgagctg	ggttttcctc	gttgctcttt	taagagggtg	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	cagggaaacc	tggtcaccgt	ctctagtgcc	420
tccaccaagg	gccccatcgt	cttccccctg	gcgccctgct	ccaggagcac	ctccgagagc	480

5

10

```

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg      540
aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga      600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca acttcggcac ccagacctac      660
acctgcaacg tagatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagacagt tgagcgcaaa      720
tgttggtcgt agtgcaccac gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttctc      780
ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacgtgcgtg      840
gtggtggacg tgagccacga agaccccag gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg      900
gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg      960
gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag     1020
gtctccaaca aaggcctccc agcccccatc 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 gacgctctcc     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

```

10

ES 2 565 189 T3

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
 <213> *Homo Sapiens*
 <400> 29

```

atggagtttg ggctgagctg ggttttccctc 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 actgtgctgag aggacgatat      360
tttgactggt tattatttga gtattggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctagtgcc      420
agcaccaagg ggccatccgt cttccccctg gcgcctctgt 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 gccccagcaac accaagggtg acaagagagt tgagtccaaa      720
tatggtcccc catgcccata atgcccagca cctgagttcc tggggggacc atcagtcttc      780
ctgttcccc caaaacccaa ggacactctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc      840
gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggtg cgtggatggc      900
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaaaggc cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt      960
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc     1020
aaggctcca acaaaggcct cccgtcctcc atcgagaaaa ccatctcca agccaaaggg     1080
cagccccgag agccacaggt gtacaccctg cccccatccc aggaggagat gaccaagaac     1140
caggtcagcc tgacctgect ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg     1200
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac     1260
ggctccttct tcctctacag caggctaacc gtgracaaga gcagggtggca ggaggggaat     1320
gtcttctcat gctccgtgac gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc     1380
tccctgtctc tgggtaaa                                     1398

```

<210> 30
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

<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

```

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
 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

<210> 32
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

5

<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
 100 105 110
 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 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

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

atgggggtcaa cgcgccatcct cgcctcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgag 60
 gtgcagctga tgcagctctgg 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 ctggacacc gccatgtatt tctgtgagag acaaagggaa 360
 ctcgactact ttgactactg gggccaggga accctggtca ccgtctctag tgcctccacc 420
 aagggcccat cggctcttccc cctggcgccc tgcctccagga gcacctccga gagcacagcg 480
 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 540
 ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc ccagctgtcc tacagtcctc aggactctac 600
 tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcaacttcg gcaccagac ctacacctgc 660

5

10

```

aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga cagttgagcg caaatgttgt 720
gtcgaagtgc caccgtgccc agcaccacct gtggcaggac cgtcagtctt cctcttcccc 780
ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggaccacct aggtcacgtg cgtggtggtg 840
gacgtgagcc acgaagacc cagaggtccag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 900
cataatgcca agacaaagcc acgggaggag cagttcaaca gcacgttccg tgtggtcagc 960
gtcctcaccg ttgtgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1020
aaciaaaggcc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aaaccaaagg gcagccccga 1080
gaaccacagg tgtacaccct 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 tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1380
ccgggtaaa 1389

```

<210> 34
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*
 <400> 34

5

```

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
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 cgccctctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgag 60
 gtgcagctga tgcagtctgg agcagaggtg aaaaagccc gggagtctct gaagatctcc 120
 tgtaaggggtt ctggatacag cttttccttc cactggatcg cctgggtgcg ccagatgccc 180

5

10

```

gggaaaggcc tggagtggat ggggatcatt catcctggtg cctctgatac cagatacagc 240
ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gccgacaact ccaacagcgc cacctacctg 300
cagtggagca gcctgaaggc ctcggacacc gccatgtatt tctgtgagag acaaagggaa 360
ctcgactact ttgactactg gggccaggga accctgggtca ccgtctctag tgccagcacc 420
aaggggcat cctgtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcc 480
gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcttc aggactctac 600
tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacgaagac ctacacctgc 660
aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagtc caaatatggt 720
ccccatgcc catcatgccc agcacctgag ttcttggggg gaccatcagt cttctctgttc 780
ccccaaaac ccaaggacac tctcatgatc tcccggacct ctgaggtcac gtgcgtgggtg 840
gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc cagtccaact ggtacgtgga tggcgtggag 900
gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc 960
agcgtctca ccgtctctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1020
tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1080
cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccaggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1140
agcctgacct gcctgggtcaa aggtttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1260
ttcttctct acagcaggct aaccgtgrac aagagcaggt ggcaggaggg gaatgtcttc 1320
tcatgtctcc tgakgcatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg 1380
tctctgggta aa 1392

```

<210> 36
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

5

<400> 36

```

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

```

10

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
 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 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

ES 2 565 189 T3

435 440 445
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 450 455 460

5
 <210> 37
 <211> 705
 <212> ADN
 <213> *Homo Sapiens*
 <400> 37

atggaagccc cagctcagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
 ggcaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catccagcc 240
 aggttcagtg gcagtggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggctccgct cactttcggc 360
 ggagggacca aggtggagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 420
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc 540
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 600
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 660
 10 ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 705

15
 <210> 38
 <211> 235
 <212> PRT
 <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

ES 2 565 189 T3

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 ctcagtcctc agactttcag tctgtgactc caaaggagaa agtcaccatc 120
 acctgccggg ccagtcagag cattggtagt agcttacct ggtaccagca gaaaccagat 180
 cagtcctcaa agctcctcat caagtatgct tcccagtcct tctcaggggt cccctcgagg 240
 ttcagtgcca gtggatctgg gacagattc accctcacca 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 gaaggaggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 540
 agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 600
 agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcacca tcagggcctg 660
 agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgt 699

10
 15
 <210> 40
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*
 <400> 40

ES 2 565 189 T3

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 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

5 <210> 41
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

<400> 41

Leu Ser Asp Ile Ala
 1 5

10 <210> 42
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

<400> 42

Val Ile Asp Glu
 1

<210> 43
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*
 5
 <400> 43

 Thr Cys Phe Ala
 1
 10
 <210> 44
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotidico para PCR
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(23)
 <223> n es a, c, t, o g
 <400> 44
 25
 ggccggatag gcctccannn nnnt 24
 <210> 45
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotidico para PCR
 35
 <400> 45
 ggacactgac atggactgaa ggagta 26
 40
 <210> 46
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> artificial
 45
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotidico para PCR
 <400> 46
 50
 ggacactgac atggactgaa ggagta 26
 <210> 47
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotidico para PCR
 <400> 47
 60
 cagcagaagc ttctagacca ccatgtgcc atcacaactc attggg 46
 <210> 48
 <211> 34

ES 2 565 189 T3

<212> ADN
<213> artificial

5 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico para PCR

<400> 48

10 cttgtcgact caacctctc ccctgtgaa gctc 34

<210> 49
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial

15 <220>
<223> secuencias de aminoácidos codificada por cebador 5' de kappa anti-IL-1R 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> Secuencias de aminoácidos codificadas por el cebador 3' de kappa anti-IL-1R 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 aacgaagggt 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
 gcccatcggg 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
 tgaatcacia gcccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagcccaaa tcttgtgaca 720
 aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc 780
 tcttcccccc aaaaccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag gtcacatgcg 840
 tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg 900
 tggagggtgca taatgccaa gacaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg 960
 tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca 1020
 aggtctccaa caaagccctc ccagccccca 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 cagggtggcag caggggaacg 1320
 tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgacg aagagcctct 1380
 ccctgtctcc gggtaaatga taagtcgac 1409

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

10 <220>
 <223> Cebador oligonucleotidico para PCR
 <400> 52

tgaggacgct gaccacacg 19

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

20 <220>
 <223> Cebador oligonucleotidico para PCR
 <400> 53

25 cagcagaagc ttctagacca ccatggggtc aaccgccatc ctgc 44

ES 2 565 189 T3

5
<210> 54
<211> 32
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> Cebador oligonucleotídico para PCR
<400> 54
10
gtggaggcac tagagacggt gaccagggt cc 32
<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial
<220>
20
<223> Secuencias de aminoácidos codificadas por el cebador 5' de cadena pesada de anti-IL-1R 15C4
<400> 55

Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu
1 5
25
<210> 56
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial
<220>
30
<223> secuencias de aminoácidos codificadas por el cebador 3' de cadena pesada de anti-IL-1R
<400> 56

Thr Ser Ala Ser Ser Val Thr Val Leu Thr Gly
1 5 10
35
<210> 57
<211> 1415
<212> ADN
40
<213> *Homo Sapiens*
<400> 57

ES 2 565 189 T3

tctagaccac catggacatg aggg[~]tccccg ctcagctcct ggggctcctg ctattgtggt 60
 tgagaggtgc cagatgtgag gtccagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtacatcctg 120
 gggggtcctt gagactctcc tgtgcaggct ctggattcac cttcagtggc catgctttgc 180
 actgggttcg ccaggctcca ggaaaaggtc tggagtgggt atcaggtatt 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 ccatcggtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct 480
 ccgagagcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg 540
 tgtcgtggaa ctcaggcgct ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtcttacagt 600
 cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcaac ttcggcacc 660
 agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagacagttg 720
 agcgc[~]aaatg ttgtgtcgag tgcccaccgt gccagcacc acctgtggca ggaccgtcag 780
 tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca 840
 cgtgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg 900
 acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt 960
 tccgtgtggt cagcgtcctc accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca 1020
 agtgc[~]aaagt ctccaacaaa ggctcccag cccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca 1080
 aagggcagcc ccgagaacca cagggtgtaca ccctgcccc atcccgggag gagatgacca 1140
 agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta ccccagcgac atcgcctggt 1200
 agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact 1260
 ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg 1320
 ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga 1380
 gcctctccct gtctccgggt aatgataag tcgac 1415

<210> 58
 <211> 1418
 <212> ADN
 <213> *Homo Sapiens*

<400> 58

tctagaccac catggacatg aggg[~]tccccg ctcagctcct ggggctcctg ctattgtggt 60
 tgagaggtgc cagatgtgag gtccagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtacatcctg 120
 gggggtcctt gagactctcc tgtgcaggct ctggattcac cttcagtggc catgctttgc 180
 actgggttcg ccaggctcca ggaaaaggtc tggagtgggt atcaggtatt ggtactcatg 240
 gtgggacata ctatgcagac tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcca 300
 agaactcctt gtttcttcaa atgaacagcc tgagcgccga ggacatggct gtgtattact 360

5

10

ES 2 565 189 T3

gtacaagaag aaactgggga caatttgact actggggcca gggAACcctg gtcaccgtct 420
ctagtgccag caccaagggg ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct 480
ccgagagcac agccgccttg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg 540
tgctcgtgaa ctCaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt 600
cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcacga 660
agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagttg 720
agtccaaata tggTccccca tgccatcat gccagcacc tgagttcctg gggggacat 780
cagtcttctt gttcccccca aaaccaagg acactctcat gatctcccgg acccctgagg 840
tcacgtgcgt ggtggtggac gtgagccagg aagaccccga ggtccagttc aactggtacg 900
tggatggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagcccg gaggagcag ttcaacagca 960
cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctCaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt 1020
acaagtgcaa ggtctccaac aaaggcctc cgtcctccat cgagaaaacc atctccaaag 1080
ccaaagggca gccccgagag ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccag gaggagatga 1140
ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg 1200
tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgctt cccgtgctgg 1260
actccgacgg ctcttctctt ctctacagca ggctaaccgt ggacaagagc aggtggcagg 1320
aggggaatgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga 1380
agagcctctc cctgtctctg ggtaaagat aagtcgac 1418

<210> 59
<211> 485
<212> PRT
<213> *Homo Sapiens*

5

<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 avidina-IL-1R1 *Cynomolgus*-FLAG protein

<400> 60

Met Val His Ala Thr Ser Pro Leu 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
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
 290 295 300
 Cys Lys Pro Leu Leu Leu Asp Asn Ile His Phe Ser Gly Val Lys Asp
 305 310 315
 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*
 <400>61

Asn Tyr Gly Met His
 1 5

10 <210> 62
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*
 15 <400> 62

Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met His
 1 5

20 <210> 63
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

ES 2 565 189 T3

<400> 63

Phe His Trp Ile Ala
1 5

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

Gly

15

<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

Gly

25

<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

Gly

35

<210> 67
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo Sapiens*

<400> 67

40

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

ES 2 565 189 T3

<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo Sapiens*
5
<400> 69

Gln Arg Glu Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

10 <210> 70
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo Sapiens*
15 <400> 70

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

20 <210> 71
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo Sapiens*
25 <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*
<400> 72

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

35 <210> 73
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo Sapiens*
40 <400> 73

Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser
1 5

45 <210> 74
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo Sapiens*
50 <400> 74

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

<210> 75
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

5 <400> 75

His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Leu Thr
 1 5

10 <210> 76
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

15 <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

20 <210> 77
 <211> 350
 <212> ADN
 <213> *Homo Sapiens*

25 <400> 77

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

30 <210> 78
 <211> 350
 <212> ADN
 <213> *Rattus sp.*

<400> 78

ES 2 565 189 T3

cctgtgatta tgagcccacg gaatgagacg atggaagctg acccaggatc cacgatacaa 60
 ctgatctgca acgtcacggg ccagttcacc gaccttgctt 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

5 <210> 79
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> *Rattus sp.*

<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

10
 15 <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
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 81
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*
 <400> 81

5

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

10

<210> 82
 <211> 120

ES 2 565 189 T3

<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
 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*
 <400> 84

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 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

ES 2 565 189 T3

<210> 85
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> *Homo Sapiens*
 5 <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

 10 <210> 86
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo Sapiens*
 15 <400> 86

 gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60
 atcacctgcc gggccagtca gagcattggt agtagcttac actggtacca gcagaaacca 120
 gatcagtcct caaagctcct catcaagtat gcttcccagt ccttctcagg ggtccccctcg 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcacctca ccatcaatag cctggaagct 240
 gaagatgctg cagcgtatta ctgtcatcag agtagtagtt tacctctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

 20 <210> 87
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> *Homo Sapiens*
 25 <400> 87

 cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag tgtctggatt caccttcagt aactatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagct atatggaatg atggagaaaa taaacacat 180
 gcaggctccg tgaggggccc attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaggacga 300
 tattttgact ggttattatt tgagtattgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctctagt 360

 30 <210> 88
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> *Homo Sapiens*
 <400> 88

ES 2 565 189 T3

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggctccgct cactttcggc 300
 ggagggacca aggtggagat caaa 324

<210> 89
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> *Homo Sapiens*

5

<400> 89

caggtgcagc tgggtggagtc 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 acagcccag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagcacgg 300
 tctttcgact ggctattatt tgagttctgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctctagt 360

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo humano aislado que se une específicamente al tercer dominio (SEQ ID NO: 76) del receptor de tipo 1 de la interleucina 1 (IL-1R1) e inhibe la unión a IL-1 β , pero no significativamente a IL-1ra, donde el anticuerpo se une específicamente a un epítipo conformacional en el tercer dominio de IL-1R1, cuyo epítipo conformacional comprende la secuencia de aminoácidos YSV.
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que es un anticuerpo Fv de una sola cadena.
- 10 3. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 o 2, que es un anticuerpo Fab, Fab' o (Fab')₂.
4. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es un anticuerpo IgG2.
- 15 5. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 6. Un anticuerpo humano aislado que se une específicamente al tercer dominio (SEQ ID NO: 76) del receptor de tipo 1 de la interleucina 1 (IL-1R1) para su uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por IL-1 en un paciente, donde la enfermedad mediada por IL-1 se selecciona de enfermedad pulmonar obstructiva crónica o EPOC, proteinosis 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 de dificultad respiratoria aguda o SDRA, displasia broncopulmonar o DBP, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas seleccionadas de enfisema y bronquitis crónica, enfermedad pulmonar fibrótica crónica, asbestosis, 25 neumoconiosis de los mineros del carbón, silicosis, neumonía organizada bronquiobliterante, sarcoidosis pulmonar, rinitis alérgica, dermatitis de contacto, dermatitis atópica, diabetes, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide, y asma; donde el anticuerpo se une específicamente a un epítipo conformacional en el tercer dominio de IL-1R1, y donde el epítipo conformacional comprende la secuencia de aminoácidos YSV, y donde el anticuerpo inhibe la señalización de la IL-1 al competir con IL-1 β por la unión a IL-1R1.
- 30 7. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, que es un anticuerpo Fv de una sola cadena.
8. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, que es un anticuerpo Fab, Fab', o (Fab')₂.
- 35 9. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 - 8, que es un anticuerpo IgG2.

FIG. 1A

Región constante de la cadena pesada de IgG1

gcctccacca	agggcccatc	ggtcttcccc	ctggcaccct	cctccaagag	cacctctggg	60
ggcacagcgg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggg	gacgggtgctg	120
tggaactcag	gcgccctgac	cagcggcgctg	cacaccttcc	cggctgtcct	acagtctca	180
ggactctact	ccctcagcag	cgtggtgacc	gtgccctcca	gcagcttggg	caccagacc	240
tacatctgca	acgtgaatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagaa	agttgagccc	300
aaatcttgctg	acaaaactca	cacatgcccc	ccgtgcccag	cacctgaact	cctgggggga	360
ccgtcagctc	tcctcttccc	ccccaaaacc	aaggacacce	tcagatctc	ccggaccct	420
gaggtcacat	gcgtgggtg	ggacgtgagc	cacgaagacc	ctgaggtcaa	gttcaactgg	480
tacgtggagc	gcgtggaggt	gcataatgcc	aagacaaagc	cgcgaggaga	gcagtacaac	540
agcacgtacc	gtgtgggtcag	cgctctcacc	gtcctgcacc	aggactggct	gaatggcaag	600
gagtacaagt	gcaaggtctc	caacaaagcc	ctcccagccc	ccatcgagaa	aaccatctcc	660
aaagccaaag	ggcagccccg	agaaccacag	gtgtacaccc	tgcccccatc	ccgggatgag	720
ctgaccaaga	accaggtcag	cctgacctgc	ctgggtcaaag	gcttctatcc	cagcgacatc	780
gccgtggagt	gggagagcaa	tgggcagccg	gagaacaact	acaagaccac	gcctcccgtg	840
ctggactccg	acggctcctt	cttctcttat	agcaagetca	ccgtggacaa	gagcaggtgg	900
cagcagggga	acgtcttctc	atgctcctg	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacag	960
cagaagagcc	tctccctgctc	tccgggtaaa				990

FIG. 1B

ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSKV	HTFPAVLQSS	60
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHKPS	NTKVDKKEP	KSCDKHTTCP	PCPAPELLGG	120
PSVFLFPPKP	KDTLMISRT	EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN	180
STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSRDE	240
LTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTPPV	LDSGSPFLY	SKLTVDKSRW	300
QQGNVFCSSV	MHEALHNHYT	QKLSLSLSPGK				330

FIG. 2A

Región constante de la cadena kappa

cgaactgtgg	ctgcaccatc	tgtcttcac	ttcccccat	ctgatgagca	gttgaatct	60
ggaactgcct	ctggtgtgtg	cctgctgaat	aacttctatc	ccagagaggc	caaagtacag	120
tggaaggtgg	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 la cadena pesada de IgG2

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

FIG. 3B

ASTKGPSVFP	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSKV	HTFPAVLQSS	60
GLYSLSSVVT	VPSSNFGTQT	YTCNVDHKPS	NTKVDKTVR	KCCVECPPCP	APPVAGPSVF	120
LFPPKPKDTL	MISRTPEVTC	VVVDVSHEDP	EVQFNWYVDG	VEVHNAKTKP	REEQFNSTFR	180
VVSVLTVVHQ	DWLNGKEYKC	KVSNKGLPAP	IEKTIISKTKG	QPREPQVYTL	PPSREEMTKN	240
QVSLTCLVKG	FYPSDIAVEW	ESNGQPENNY	KTTTPMLDSD	GSFFLYSKLT	VDKSRWQQGN	300
VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL	SLSPGK				326

FIG. 4A

Región constante de la cadena pesada de IgG4

gccagcacca	aggggccatc	cgtcttcccc	ctggcgccct	gctccaggag	cacctccgag	60
agcacagccg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggt	gacggtgtcg	120
tggaaactcag	gcgccectgac	cagcggcgtg	cacaccttcc	cggctgtcct	acagtccctca	180
ggactctact	ccctcagcag	cgtggtgacc	gtgcccctcca	gcagcttggg	cacgaagacc	240
tacacctgca	acgtagatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagag	agttgagtcc	300
aaatatggtc	ccccatgccc	atcatgccc	gcacctgagt	tcctgggggg	accatcagtc	360
ttcctgttcc	ccccaaaacc	caaggacact	ctcatgatct	cccggacccc	tgaggtcacg	420
tgcgtgggtg	tggacgtgag	ccaggaagac	cccaggttcc	agttcaactg	gtacgtggat	480
ggcgtggagg	tgcataatgc	caagacaaa	cccggggagg	agcagttcaa	cagcacgtac	540
cgtgtggtca	gcgtcctcac	cgtcctgcac	caggactggc	tgaacggcaa	ggagtacaag	600
tgcaaggtct	ccaacaaagg	cctcccgtcc	tccatcgaga	aaaccatctc	caaagccaaa	660
gggcagcccc	gagagccaca	ggtgtacacc	ctgccccat	cccaggagga	gatgaccaag	720
aaccaggtca	gcctgacctg	cctgggtcaa	ggcttctacc	ccagcgacat	cgccgtggag	780
tgggagagca	atgggcagcc	ggagaacaac	tacaagacca	cgcctcccgt	gctggactcc	840
gacggctcct	tcttcctcta	cagcaggcta	accgtgraca	agagcaggtg	gcaggagggg	900
aatgtcttct	catgctccgt	gakgcatgag	gctctgcaca	accactacac	acagaagagc	960
ctctccctgt	ctctgggtaa	a				981

FIG. 4B

ASTKGPSVFP	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSKV	HTFPAVLQSS	60
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTKT	YTCNVDHKPS	NTKVDKRVES	KYGPPCPSCP	APEFEGGPSV	120
FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSDQED	PEVQFNWYVD	GVEVHNAKTK	PREEQFNSTY	180
RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKGLPS	SIEKTISKAK	GPQPREPQVYT	LPPSQEEMTK	240
NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPVLDS	DGSFFLYSRL	TVDKSRWQEG	300
NVFSCSVHHE	ALHNHYTQKS	LSLSLGK				327

FIG. 5A

Cadena pesada 26F5

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	ggggccgatt	caccatctcc	agagacaatt	ccaagaacac	gctgtatctg	300
caaatgaaca	gcccgagagc	cgaggacacg	gctgtgtatt	actgtgcgag	agcacggtct	360
ttcgactggc	tattatttga	gttctggggc	caggaaccc	tggtcacctg	ctctagt	417

FIG. 5B

MEFGLSWVFL	VALLRGVQCQ	VQLVESGGGV	VQPGRSLRLS	CAASGFTFSN	YGMHWVRQAP	60
GKGLEWVAGI	WNDGINKYHA	HSVRGRFTIS	RDNSKNTLYL	QMNSPRAEDT	AVYYCARARS	120
FDWLLFEFWG	QGTLVTVSS					139

FIG. 6A

Cadena kappa 26F5

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

FIG. 6B

MEAPAQLLFL	LLLWLPDTTG	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SYLAWYQQKP	60
GQAPRLLIYD	ASNRATGIPA	RFSGSGSGTD	FTLTISSLEP	EDFAVYYCQQ	RSNWPPLTFG	120
GGTKVEIK						128

FIG. 7A

Cadena pesada 27F2

atggagtttg	ggctgagctg	ggttttcctc	gttgctcttt	taagaggtgt	ccagtgtcag	60
gtgcagctgg	tggagtctgg	gggagggctg	gtccagcctg	ggaggtccct	gagactctcc	120
tgtgcagtg	ctggattcac	cttcagtaac	tatggcatgc	actgggtccg	ccaggetcca	180
ggcaaggggc	tggagtgggt	ggcagctata	tggaatgatg	gagaaaataa	acaccatgca	240
ggctccgtga	ggggccgatt	caccatctcc	agagacaatt	ccaagaacac	gctgtatctg	300
caaatgaaca	gcctgagagc	cgaggacacg	gctgtgtatt	actgtgagag	aggacgatat	360
tttgactggt	tattatttga	gtattggggc	caggggaacc	tggtcaccgt	ctctagt	417

FIG. 7B

MEFGLSWVFL	VALLRGVQCQ	VQLVESGGGV	VQPGRSLRLS	CAVSGFTFSN	YGMHWVRQAP	60
GKGLEWVAAI	WNDGENKHHA	GSVRGRFTIS	RDNSKNTLYL	QMNSLRAEDT	AVYYCARGRY	120
FDWLLFEYWG	QGTLTVVSS					139

FIG. 8A

Cadena pesada 15C4

atgggggtcaa	ccgccatcct	cgccctcctc	ctggctgttc	tccaaggagt	ctgtgccgag	60
gtgcagctga	tgcagtctgg	agcagaggtg	aaaaagcccg	gggagtctct	gaagatctcc	120
tgtaagggtt	ctggatacag	cttttccttc	cactggatcg	cctgggtgcg	ccagatgcc	180
gggaaaggcc	tggagtggat	gggatcatc	catcctggtg	cctctgatac	cagatacagc	240
ccgtccttcc	aaggccaggt	caccatctca	gccgacaact	ccaacagcgc	cacctacctg	300
cagtggagca	gcctgaaggc	ctcggacacc	gccatgtatt	tctgtgagag	acaaagggaa	360
ctcgactact	ttgactactg	gggccagggg	accctggtca	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 15C4

atgtcgccat	cacaactcat	tgggtttctg	ctgctctggg	tccagcctc	caggggtgaa	60
attgtgctga	ctcagtctcc	agactttcag	tctgtgactc	caaaggagaa	agtcaccatc	120
acctgccggg	ccagtcagag	cattggtagt	agcttacact	ggtaccagca	gaaaccagat	180
cagtctcaa	agctcctcat	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	FSGSGGTDF	TLTINSLEAE	DAAAYYCHQS	SSLPLTFGGG	120
TKVEIK						126

FIG. 10

				CDR1		CDR2
26F5	QVQLVESGGG	VVQPRSLRL	SCAASGFTFS	<u>NYGMHWVRQA</u>	PGKGLEWVAG	<u>IWNDGINKYH</u>
27F2	QVQLVESGGG	VVQPRSLRL	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	TAVYYCARAR	<u>SFDWLLFEFW</u>	GQGLTVTVSS
27F2	<u>AGSVRGRFTI</u>	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGR	<u>YFDWLLFEYW</u>	GQGLTVTVSS
15C4	<u>SPSFQGQVTI</u>	SADNSNSATY	LQWSSLKASD	TAMYFCARQR	<u>ELDYFDYWGQ</u>	GTLTVTVSS

FIG. 11

		CDR1			
26F5/27F2	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	<u>LSCRASQSVS</u>	<u>SYLAWYQQKP</u>	GOAPRLLIYD
15C4	EIVLTQSPDF	QSVTPKEKVT	<u>ITCRASQSIG</u>	<u>SSLHWYQQKP</u>	DQSPKLLIKY
		CDR2		CDR3	
26F5/27F2	<u>ASN</u> RATGIPA	RFSGSGSGTD	FTLTISSLEP	EDFAVYYCQQ	<u>RSNWPPLTFG</u>
15C4	<u>ASQSF</u> SGVPS	RFSGSGSGTD	FTLTINSLEA	EDAAAYYCHQ	<u>SSSLPLTFGG</u>
26F5/27F2	GGTKVEIK				
15C4	GTKVEIK				

FIG. 12

Competición de la formación del
complejo IL-1R1/IL-1 β /RAcP

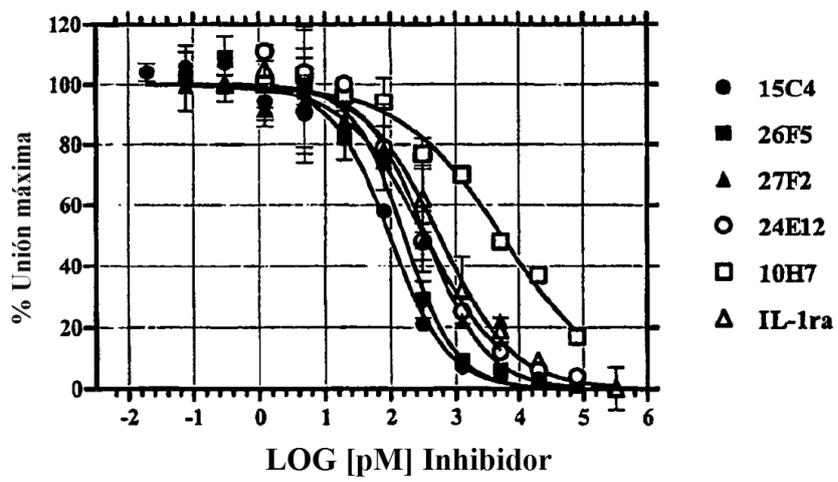


FIG. 13

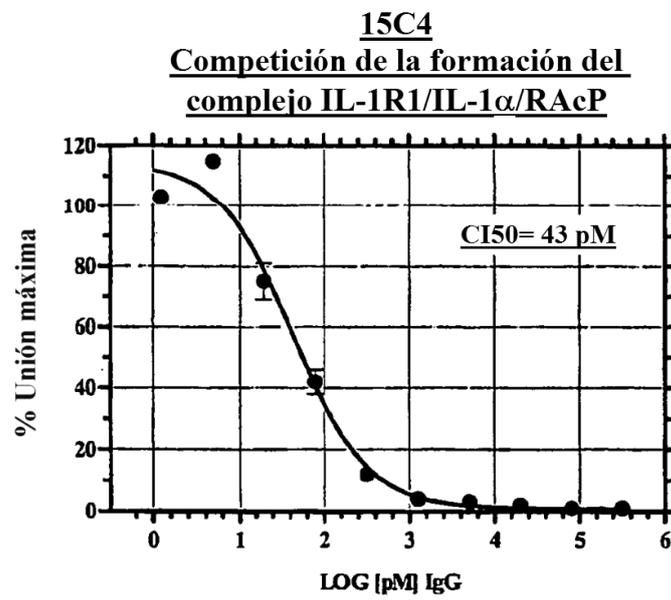


FIG. 14

**Competición de la unión de IL-1 β e IL-1ra
a IL-1R1**

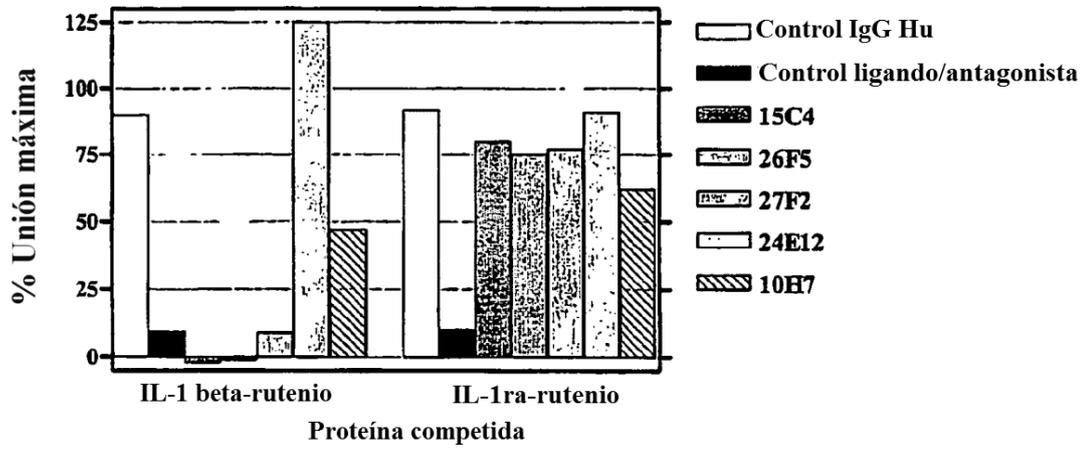


FIG. 15A

Inhibición de la producción de IL-6 inducida por IL-1 en condrocitos humanos primarios

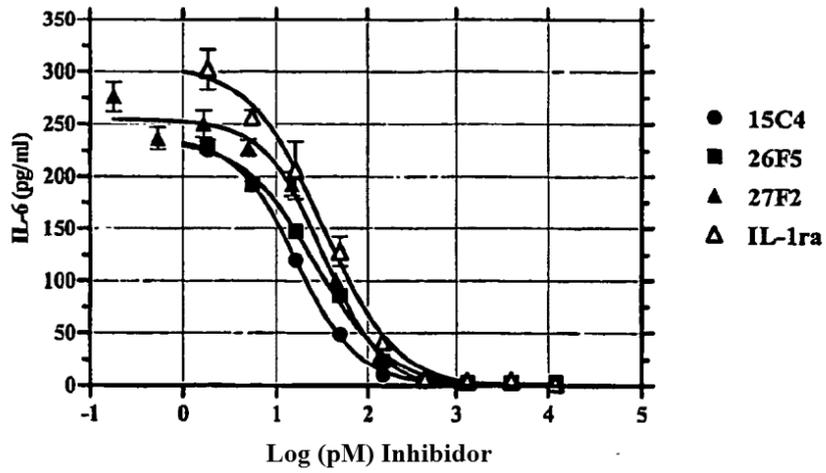


FIG. 15B

Inhibición de IL-6 inducida por IL-1 en condrocitos humanos primarios

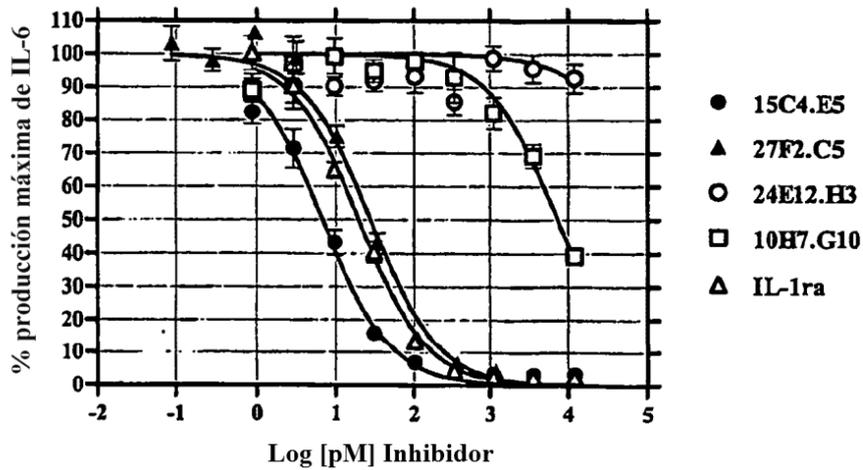


FIG. 16

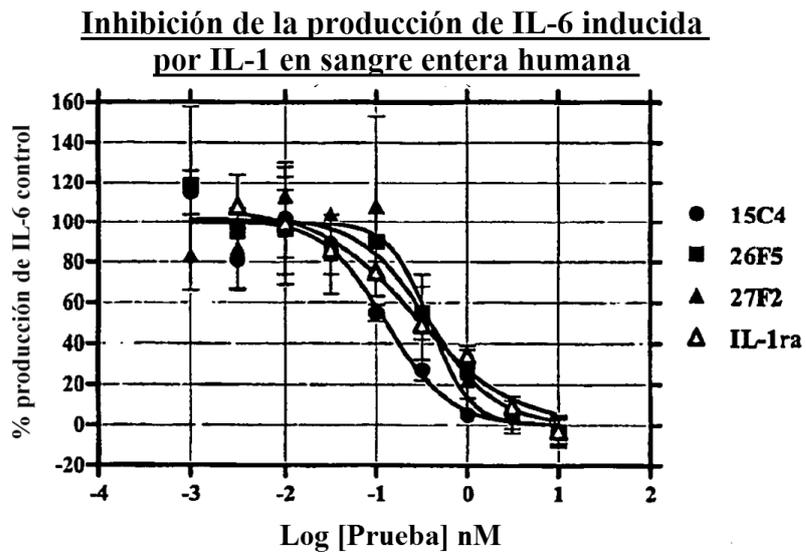


FIG. 17

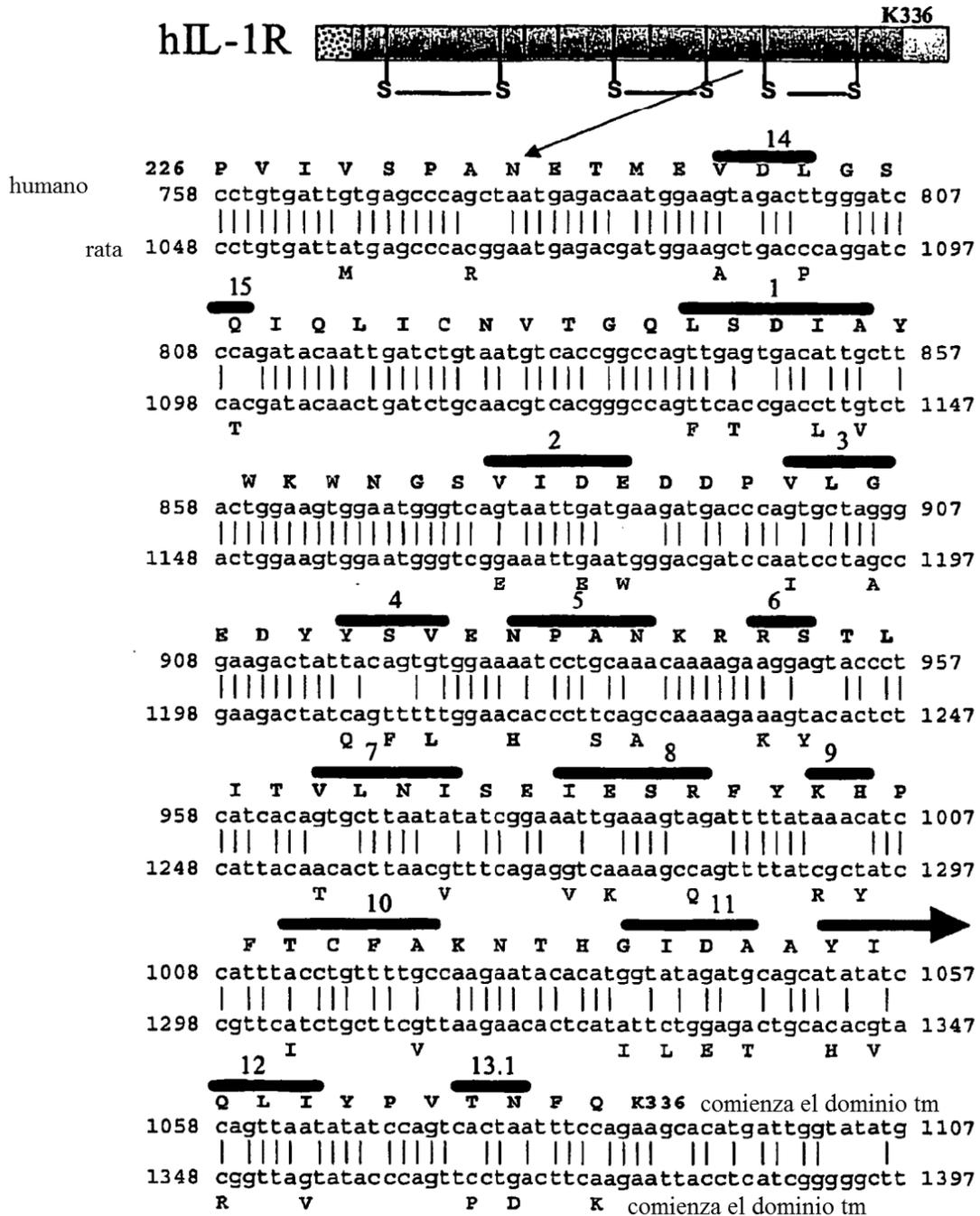


FIG. 18

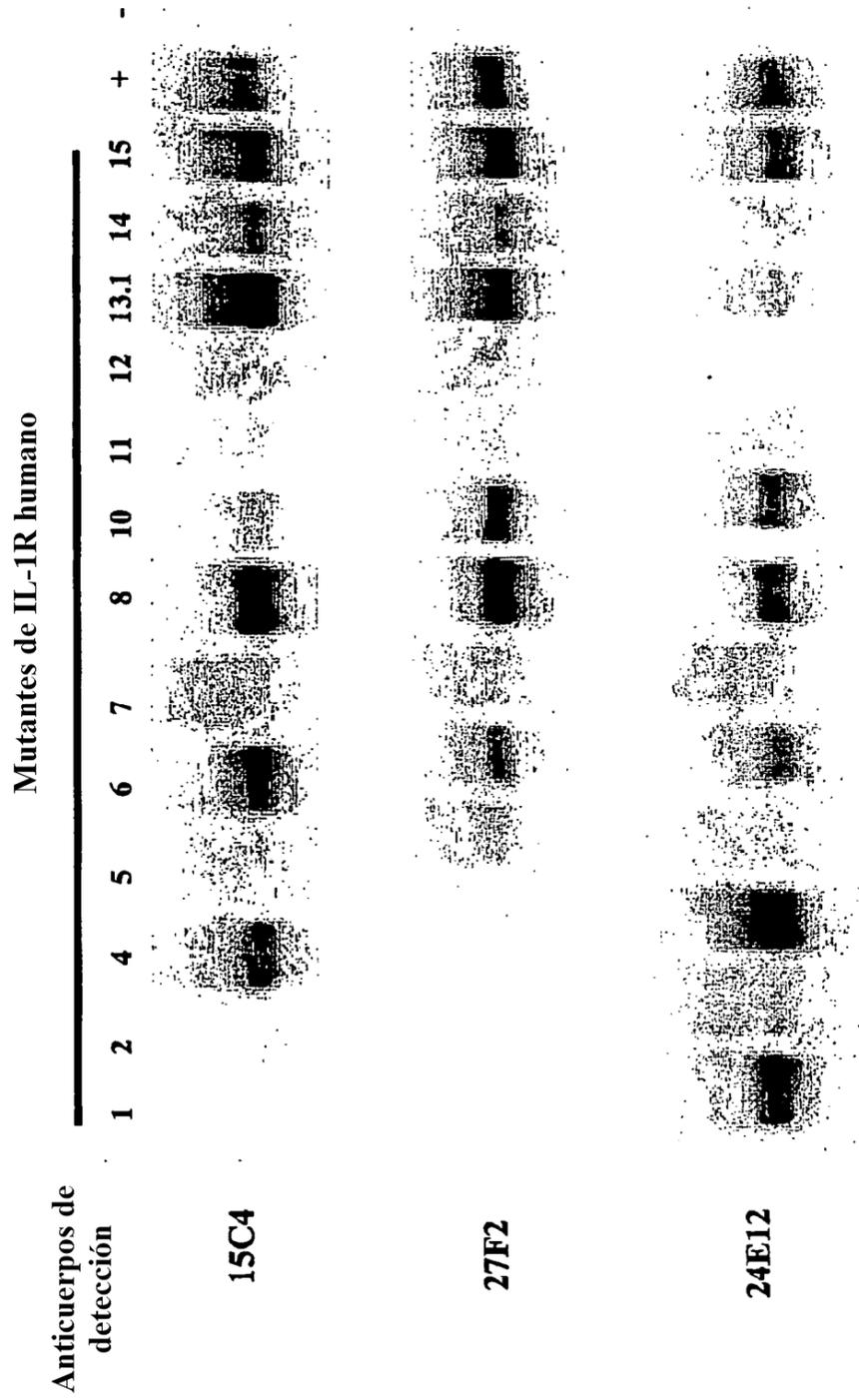
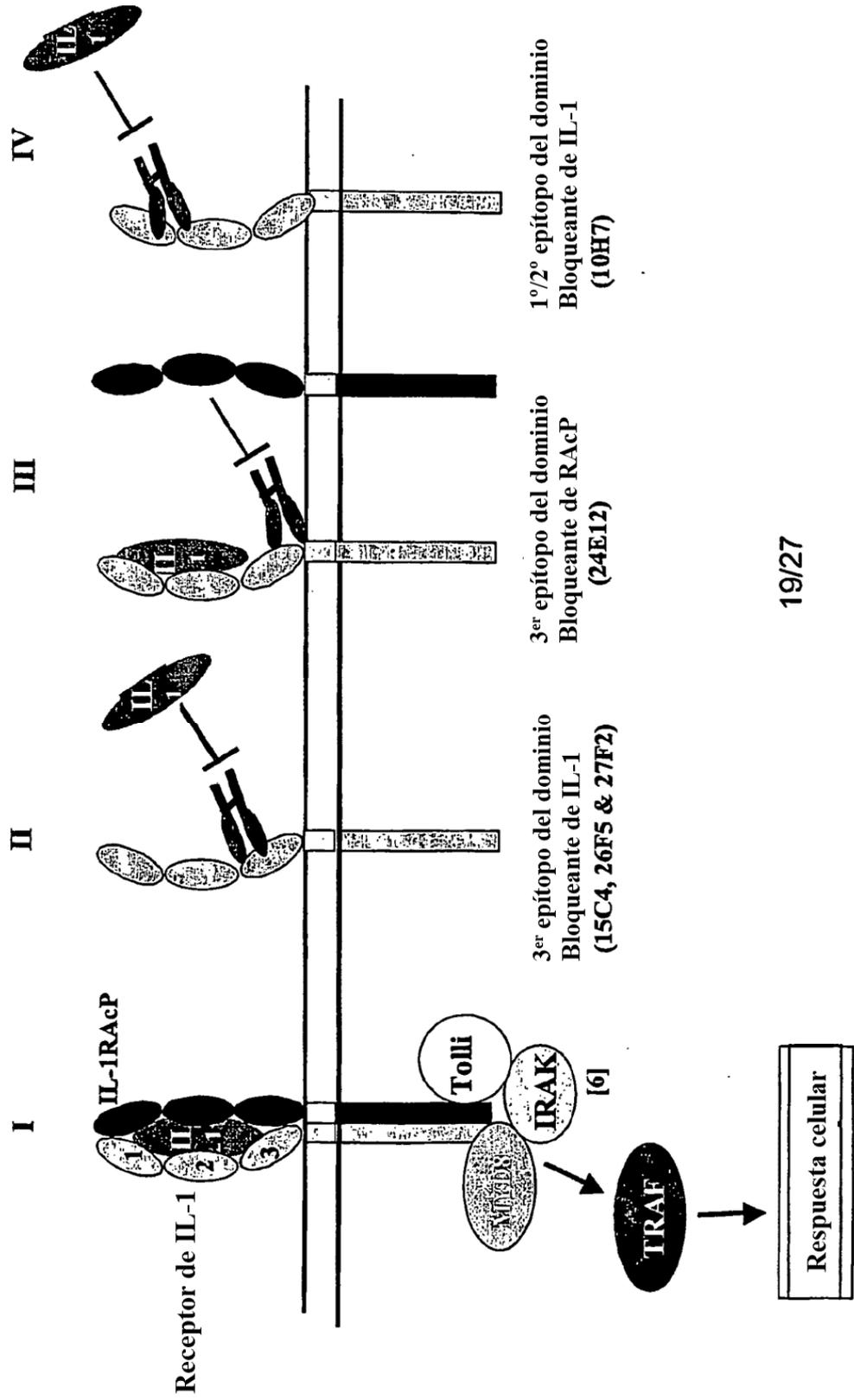


FIG. 19



19/27

FIG. 20



FIG. 21

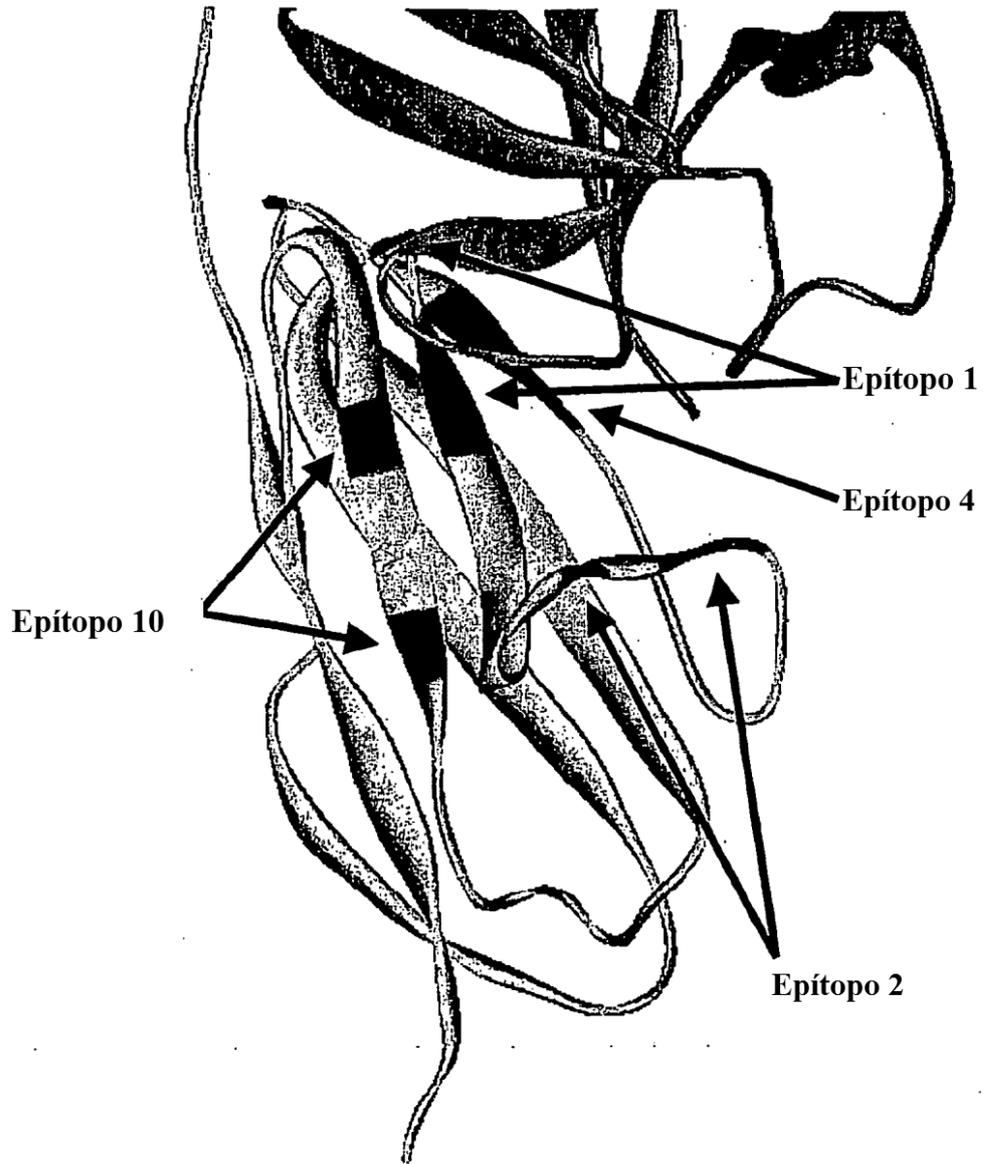


FIG. 22

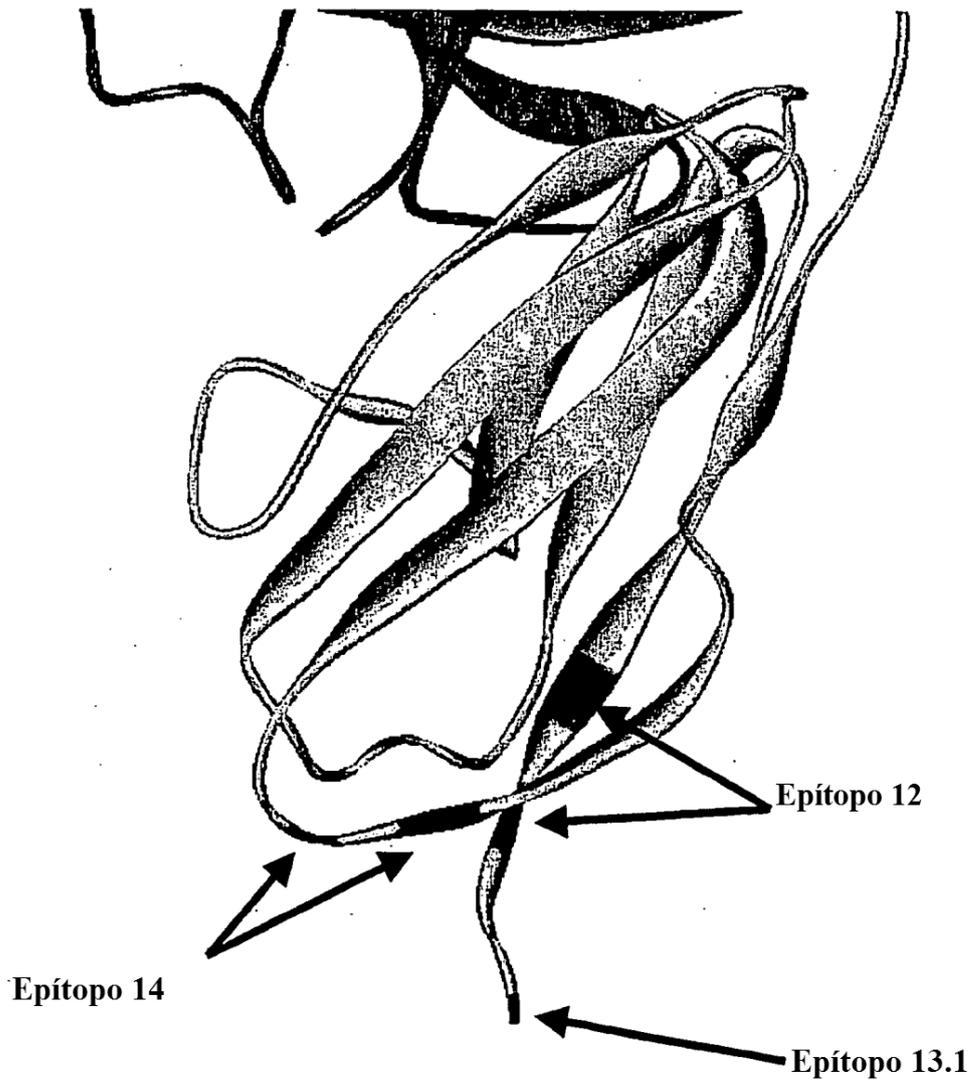


FIG. 23

MVHATSPLLL	LLLLSLALVA	PGLSARKCSL	TGKWTNDLGS	NMTIGAVNSK	GEFTGTYTTA	60
VTATSNEIKE	SPLHGTQNTI	NKRTQPTFGF	TVNWKFSEST	TVFTGQCFID	RNGKEVLKTM	120
WLLRSSVNDI	GDDWKATRVG	INIFTRLRTQ	KEQLLASLLE	ADKCKEREEK	IILVSSANEI	180
DVRPCPLNPN	EHKGTITWYK	DDSKTPVSTE	QASRIHQHKE	KLWFVPAMVE	DSGHYYCVVR	240
NSSYCLRIKI	SAKFVENEEN	LCYNAQAIFK	QKLPVAGDGG	LVCPYMEFFK	NENNELPKLQ	300
WYKDCKPLLL	DNIHFSGVKD	RLIVMNVAEK	HRGNYTCHAS	YTYLGKQYPI	TRVIEFITLE	360
ENKPTRPVIV	SPANETMEVD	LGSQIQLICN	VTGQLSDIAY	WKWNGSVIDE	DDPVLGEDYY	420
SVENPANKRR	STLITVLNIS	EIESRFYKHP	FTCFAKNTHG	IDAAYIQLIY	PVTNPFQKDYK	480
DDDDK						485

FIG. 25A

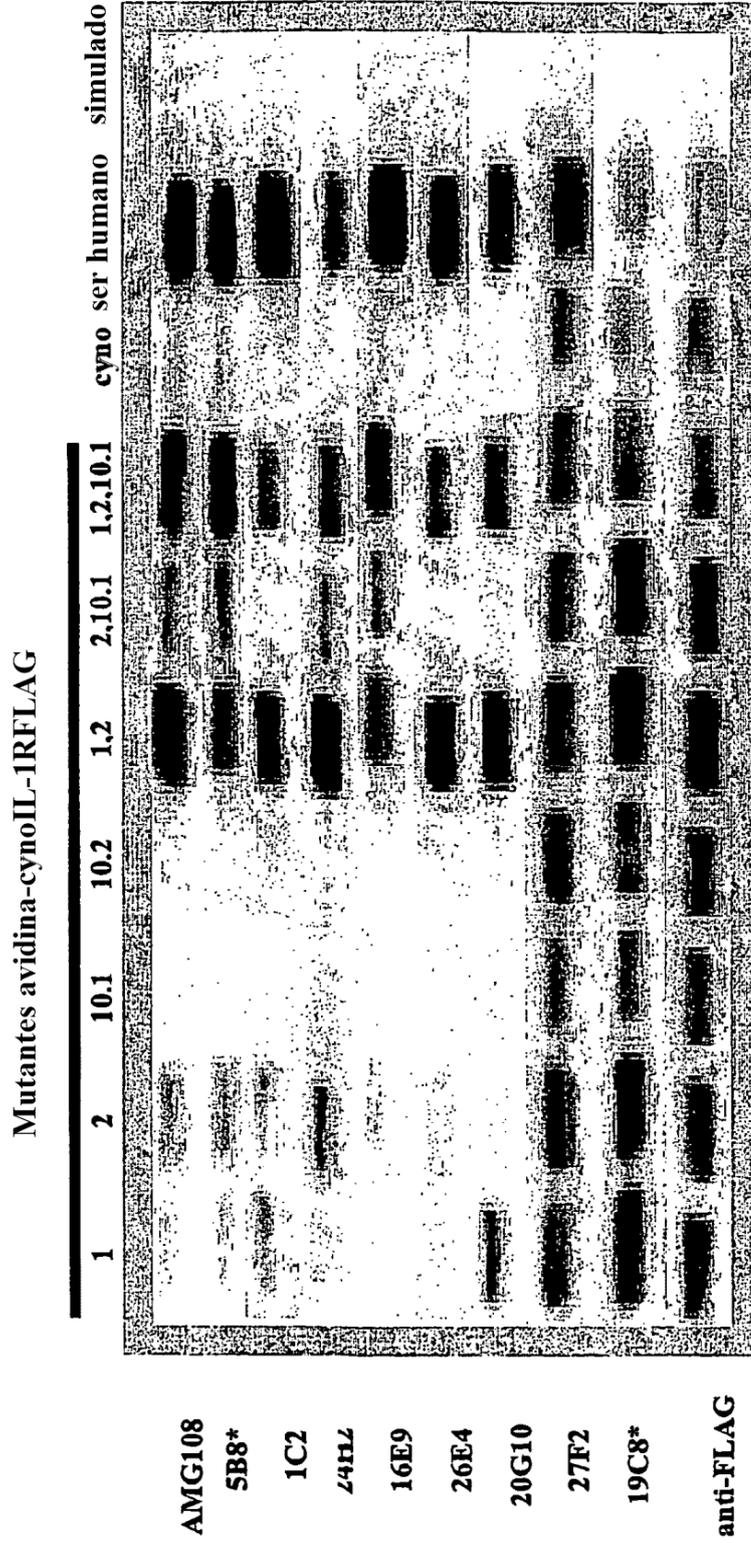
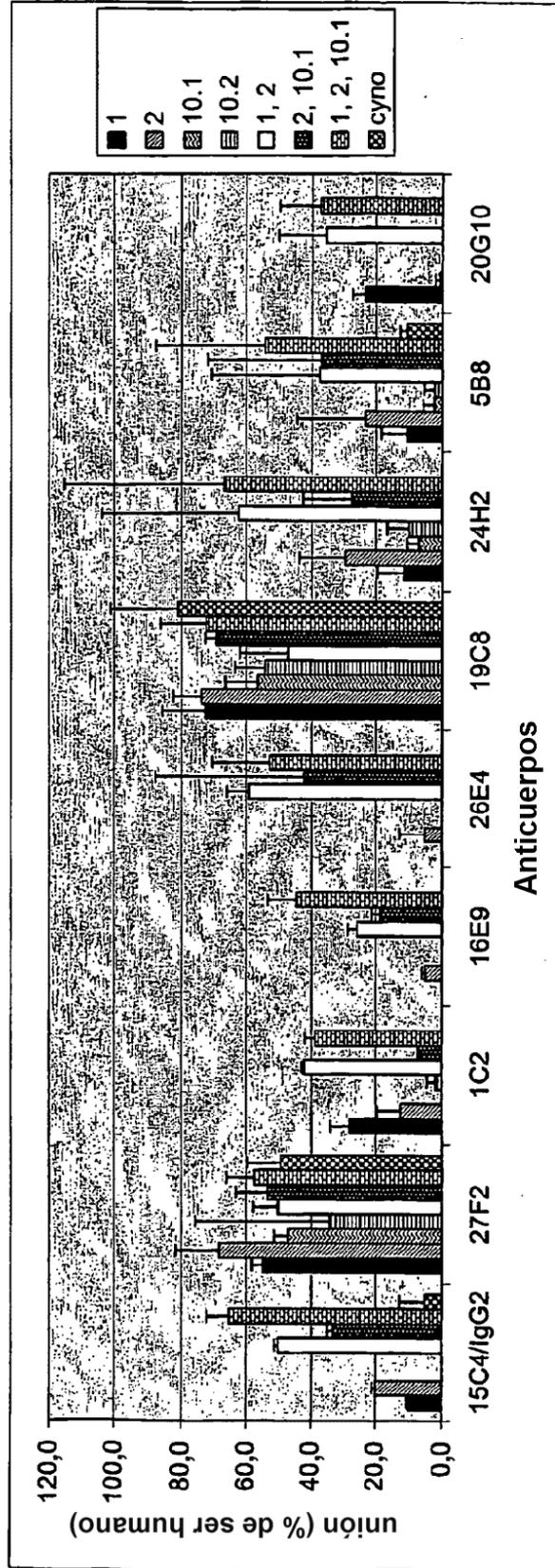


FIG. 25B



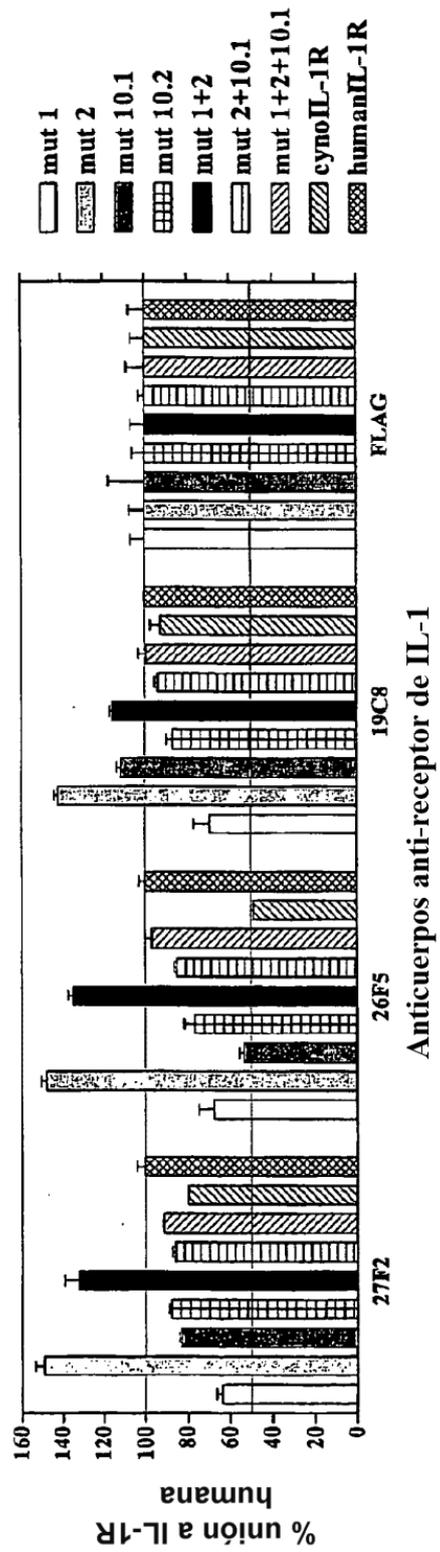
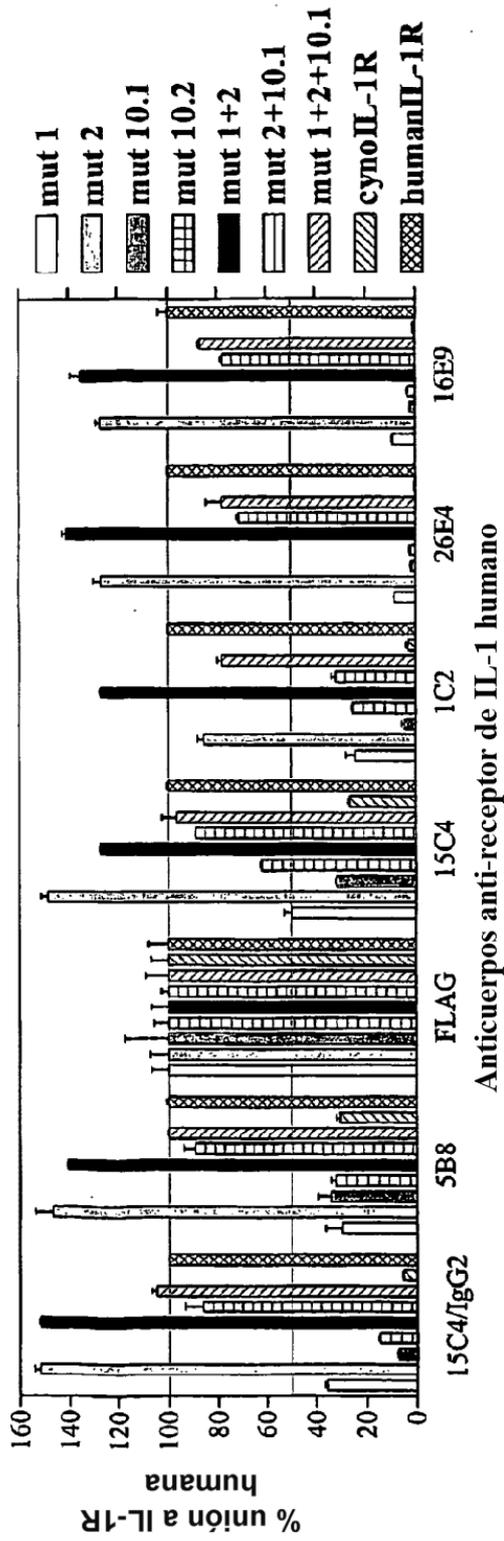


FIG. 26