

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 198**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2004 E 04703964 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 1590369**

54 Título: **Antagonistas de la IL-1 beta humana**

30 Prioridad:

24.01.2003 US 442798 P

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

20.04.2016

73 Titular/es:

**APPLIED MOLECULAR EVOLUTION, INC.
(100.0%)
3520 DUNHILL STREET
SAN DIEGO, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**DICKINSON, CRAIG DUANE;
VASSEROT, ALAIN PHILIPPE;
WATKINS, JEFFRY DEAN y
LU, JIRONG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 567 198 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

Antagonistas de la IL-1 beta humana

Antecedentes de la invención

5 La interleucina-1 β (IL-1 β) es una citocina proinflamatoria. La sobreproducción de IL-1 β se ha implicado en la patogenicidad de una diversidad de enfermedades tales como la artritis reumatoide y la osteoartritis. IL-1 β ha demostrado que aumenta la migración celular a la membrana sinovial inflamada de las articulaciones mediante la regulación positiva de moléculas de adhesión, la estimulación de la producción de prostaglandinas y la metaloproteinasas, la inhibición de la síntesis de colágeno y de proteoglicanos, y la estimulación de la resorción ósea osteoclástica. Debido a estas propiedades, IL-1 β es uno de los principales mediadores de la destrucción del hueso y el cartílago en la artritis. Por lo tanto, los agentes que reducen la actividad de IL-1 β representan posibles tratamientos para enfermedades tales como la artritis.

15 Existen tres miembros de la familia de genes IL-1: IL-1 α , IL-1 β , y los antagonistas del receptor de IL-1 (arIL-1). IL-1 α e IL-1 β son agonistas del receptor de IL-1 mientras que arIL-1 es un antagonista de receptor específico y, por lo tanto, un inhibidor competitivo endógeno de IL-1. La administración de arIL-1 recombinante a pacientes en ensayos clínicos proporcionó mejoras clínicas significativas en pacientes con artritis reumatoide grave en comparación con el placebo. Además, la administración de arIL-1 reduce la velocidad del daño articular progresivo. Sin embargo, las malas propiedades farmacocinéticas y la gran dosis que se debe administrar hacen que arIL-1 recombinante no sea un agente terapéutico ideal.

20 Un anticuerpo neutralizante de IL-1 β de alta afinidad sería un agente terapéutico superior. Las típicas semividas de eliminación largas de los anticuerpos, aparejados con la unión de alta afinidad, da como resultado un producto terapéutico con una dosis y una frecuencia reducidas, en comparación con arIL-1 recombinante. A pesar de que se han descrito varios anticuerpos de IL-1 β , ha sido excesivamente difícil identificar anticuerpos monoclonales que tengan alta afinidad, alta especificidad, y potente actividad neutralizante.

25 La presente invención abarca anticuerpos de IL-1 β humanizados obtenidos de Mu007, un anticuerpo murino exclusivo dirigido frente a IL-1 β humana (véase el documento PCT/US02/21281). Estos anticuerpos son anticuerpos de alta afinidad con estabilidad mejorada que tienen potente actividad neutralizante de IL-1 β y son altamente específicos para IL-1 β .

El documento WO 02/16436 desvela un anticuerpo monoclonal neutralizante anti IL-1 β para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por IL-1, tal como osteoartritis, osteoporosis y otras artritis inflamatorias.

30 **Sumario de la invención**

La invención abarca un anticuerpo aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une de forma específica a IL-1 β humana. De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se proporciona un anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que se une de forma específica a IL-1 β humana, en el que dicho anticuerpo comprende:

- 35 a) una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39;
- b) una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;
- c) una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41;
- d) una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10;
- 40 e) una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21; y,
- f) una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38.

Preferentemente el anticuerpo de la presente invención comprende una región variable de cadena pesada que codifica la secuencia de polinucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 56 y una región variable de cadena ligera que codifica la secuencia de polinucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 61.

45 Más preferentemente, el anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada que codifica la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 47 y una cadena ligera que codifica la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 48.

Aún más preferentemente, el anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada que codifica la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 68 y una cadena ligera que codifica la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 48.

50 El anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de la presente invención, tiene un isotipo IgG y se selecciona de regiones constantes de cadena pesada de IgG1 e IgG4.

Preferentemente, el anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de la presente invención, tiene un isotipo IgG1 que codifica el polinucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 65.

Como alternativa, el anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de la presente invención, tiene un isotipo IgG4 que codifica el polinucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 66.

5 El anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de la presente invención, preferentemente tiene una región constante de cadena kappa de cadena ligera que codifica el polinucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 67.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende cultivar la célula hospedadora descrita anteriormente y recuperar del cultivo el polipéptido que codifica dicho polinucleótido.

10 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para mejorar la estabilidad de un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une de forma específica a IL-1 β humana, en el que dicho procedimiento comprende eliminar la desamidación en la posición 6 de la HCDR2 (SEQ ID NO: 21) o la posición 55 de la HCVR (SEQ ID NO: 56).

15 La invención incluye anticuerpos que se unen a IL-1 β humana madura con una K_d de 1×10^{-11} M o menor, y se disocia de IL-1 β humana madura con una constante de velocidad k_{off} de $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ o menor, según se determina mediante resonancia de plasmón superficial (tampón HBS-EP, pH 7,4 a 25 °C), y neutraliza la actividad de IL-1 β humana en un ensayo de proliferación de T1165.17 convencional.

20 La invención adicionalmente proporciona anticuerpos, preferentemente anticuerpos humanizados, o porciones de unión a antígeno del mismo, en los que la desamidación se elimina en la posición 6 de la región determinante de complementariedad 2 de cadena pesada (HCDR2; SEQ ID NO: 21) o en la posición 55 de la HCVR (SEQ ID NO: 56), lo que da como resultado la estabilidad mejorada.

La invención incluye anticuerpos humanizados que comprenden un armazón variable de cadena ligera de origen humano y tres CDR y un armazón variable de cadena pesada de origen humano y tres CDR que tienen secuencias de aminoácidos que codifican las secuencias de polinucleótido que corresponden a las SEQ ID NO: 55-64.

25 De forma adicional, la invención incluye anticuerpos humanizados que comprenden un armazón variable de cadena ligera de origen humano y tres CDR y un armazón variable de cadena pesada de origen humano y tres CDR que tienen secuencias de aminoácidos que corresponden a las SEQ ID NO: 48-54, y 68.

30 La invención incluye ácidos nucleicos aislados que comprenden polinucleótidos que codifican los anticuerpos descritos y reivindicados en el presente documento. La invención también abarca vectores de expresión y células hospedadoras transfectadas con estos polinucleótidos que expresan los anticuerpos descritos y reivindicados en el presente documento.

La invención abarca procedimientos para el tratamiento de la artritis reumatoide y la osteoartritis, los cuales comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo descrito y reivindicado en el presente documento, así como un procedimiento de inhibición de la destrucción de cartílago que se produce en sujetos que son propensos a, o tienen artritis.

35 La invención adicionalmente abarca procedimientos de tratamiento de la neuroinflamación asociada con ictus y traumatismo craneal isquémico, excitotóxico y traumático, que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo descrito y reivindicado en el presente documento.

40 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un anticuerpo de acuerdo con la presente invención para su uso como un medicamento. Preferentemente, el anticuerpo se utiliza en el tratamiento de la artritis reumatoide o de la osteoartritis.

La invención aún abarca adicionalmente el uso de un anticuerpo para la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto con artritis reumatoide, osteoartritis, o para inhibir la destrucción de cartílago en un sujeto que lo necesite.

45 Finalmente, la invención abarca adicionalmente el uso de un anticuerpo para la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto con neuroinflamación asociada con ictus y traumatismo craneal isquémico, excitotóxico, y traumático.

Descripción detallada de la invención

50 La invención abarca anticuerpos humanos aislados, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que constan esencialmente de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo Mu007 (SEQ ID NO: 1-6) pero en los que las estructuras de polipéptido contienen una o más diferencias de aminoácidos en una o más de las CDR de los mismos. El armazón y otras porciones de estos anticuerpos pueden proceder de una línea germinal de ser humano. Las versiones humanizadas de Mu007 se unen a IL-1 β humana con alta afinidad, y una velocidad "off" lenta y tienen una alta capacidad neutralizante. Diversos aspectos de la invención se refieren a anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, y composiciones farmacéuticas de los mismos, así como ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante y células hospedadoras para fabricar tales anticuerpos y fragmentos. La invención también

abarca los procedimientos para la utilización de los anticuerpos de la invención para inhibir la actividad de IL-1 β humana.

Para que la presente invención pueda comprenderse más fácilmente, primero se definen determinados términos.

5 El término "anticuerpo", como se utiliza en el presente documento, se pretende que se refiera a moléculas de inmunoglobulinas que constan de cuatro cadenas de polipéptido, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada consta de una región variable de cadena pesada (en el presente documento abreviado como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada consta de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera consta de una región variable de cadena ligera (en el presente documento abreviado como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera consta de un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementareidad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y de cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

15 Las cadenas ligeras se clasifican como kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligera y pesada, las regiones variable y constante están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 3 o más aminoácidos.

20 Los anticuerpos IgG son las inmunoglobulinas más abundantes en el suero. Las IgG también tienen las semividuas en suero más largas de cualquier inmunoglobulina. A diferencia de otras inmunoglobulinas, la IgG se recircula de forma eficaz después de la unión a FcRn. Hay cuatro subclases de IgG; G1, G2, G3, y G4, cada una de las cuales tiene distintas funciones efectoras. G1, G2, y G3 pueden unirse a C1q y fijar complemento, mientras que G4 no puede hacerlo. A pesar de que G3 es capaz de unirse a C1q de forma más eficaz que G1, G1 es más eficaz en la mediación de la lisis celular dirigida por el complemento. G2 fija el complemento de forma muy ineficaz. El sitio de unión a C1q en IgG se localiza en la región carboxilo terminal del dominio CH2.

Todas las subclases de IgG son capaces de unirse a los receptores de Fc (CD16, CD32, CD64), siendo G1 y G3 más eficaces que G2 y G4. La región de la IgG de unión al receptor de Fc está formada por restos localizados en las regiones bisagra y carboxilo terminal del dominio CH2.

30 La expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), como se utiliza en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conserva la capacidad de unirse de forma específica a un antígeno (por ejemplo, IL-1 β humana). Se ha demostrado que la función de la unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH I; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward y col., (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementareidad aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados en genes separados, se los puede unir utilizando procedimientos recombinantes, mediante un conector sintético que permita fabricarlos como una cadena de proteína única en la cual las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); véase por ejemplo, Bird y col. (1988) Science 242: 423-426; y Huston y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). También se pretende que tales anticuerpos monocatenarios estén abarcados dentro de la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. También están abarcadas otras formas de anticuerpos monocatenarios, tales como los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes biespecíficos, en los cuales los dominios VH y VL se expresan en una cadena polipeptídica única, pero que utilizan un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de este modo a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena, y creando dos sitios de unión a antígeno (véase por ejemplo, Holliger, P., y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R. J., y col. (1994) Structure 2: 1121-1123).

Aún más, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión más grande, formada por la asociación covalente o no covalente del anticuerpo o porción de anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos. Los ejemplos de tales moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región del núcleo de la estreptavidina para fabricar una molécula tetramérica scFv (Kipriyanov, S. M., y col. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6: 93-101) y el uso de un resto de cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidina C-terminal para fabricar moléculas de scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S. M., y col. (1994) Mol. Immunol. 31: 1047-1058). Las porciones de anticuerpos, tales como los fragmentos Fab y F(ab')₂, se pueden preparar a partir de anticuerpos completos utilizando técnicas convencionales, tales como la digestión de anticuerpos completos con papaína o pepsina, respectivamente. Además, los anticuerpos,

porciones de anticuerpo y moléculas de inmunoadhesión, se pueden obtener utilizando técnicas de ADN recombinante convencionales, como se describe en el presente documento.

5 La expresión "anticuerpo humanizado" significa un anticuerpo que consta, parcialmente o completamente, de secuencias de aminoácidos obtenidas de una línea germinal de anticuerpos de ser humano o una secuencia reordenada y fabricada alterando la secuencia de un anticuerpo que tiene regiones determinantes de complementareidad (CDR) que no son de ser humano. Las regiones marco conservadas de las regiones variables se sustituyen por las regiones marco conservadas humanas correspondientes. Como se discute en el presente documento, anticuerpo en el contexto de anticuerpo humanizado no se limita a un anticuerpo de longitud completa, y puede incluir fragmentos y formas monocatenarias.

10 La expresión "anticuerpo de ser humano recombinante", como se utiliza en el presente documento, se pretende que incluya a todos los anticuerpos de ser humano que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora, anticuerpos aislados a partir de una biblioteca de anticuerpos de ser humano recombinante combinatoria, anticuerpos aislados a partir de un animal (por ejemplo, un ratón) que sea transgénico para los genes de inmunoglobulina de ser humano (véase, por ejemplo, Taylor, L. D., y col. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20: 6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulinas de ser humano a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos de ser humano recombinantes tienen regiones variables y constantes obtenidas de secuencias de inmunoglobulinas de línea germinal de ser humano. En determinadas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos de ser humano recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se utiliza un animal transgénico para las secuencias de Ig de ser humano, mutagénesis somática *in vivo*) y así, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque que se obtuvieron de, y se relacionan con las secuencias de VH y VL de línea germinal de ser humano, pueden no existir de forma natural en el repertorio de la línea germinal de anticuerpos de ser humano *in vivo*.

25 Un "anticuerpo aislado", como se utiliza en el presente documento, se pretende que se refiera a un anticuerpo que está esencialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas distintas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une de forma específica a IL-1β humana está esencialmente libre de anticuerpos que se unen de forma específica a antígenos distintos de IL-1β humana). Un anticuerpo aislado que se une de forma específica a IL-1β humana puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas IL-1β de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar esencialmente libre de otros materiales y/o químicos celulares.

30 Un "anticuerpo neutralizante", como se utiliza en el presente documento (o un "anticuerpo que neutraliza la actividad de IL-1β humana"), se pretende que se refiera a un anticuerpo cuya unión a IL-1β humana da como resultado la inhibición de la actividad biológica de IL-1β humana. La medición de uno o más indicadores de la actividad biológica de IL-1β, como se determina utilizando el bioensayo de células T1165.17 o el protocolo de neutralización de IL-1β humana descritos en el presente documento, puede evaluar esta inhibición de la actividad biológica de IL-1β humana.

35 Los anticuerpos que "se unen de forma específica" a IL-1β humana madura incluyen anticuerpos, como se define anteriormente, que se unen a la forma madura de IL-1β humana conocida en la técnica y no se unen a IL-1α de ser humano madura. Un anticuerpo que se une de forma específica a IL-1β humana madura puede mostrar algo de reactividad cruzada con IL-1β madura de otras especies.

40 La expresión "resonancia de plasmón superficial", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real, mediante la detección de modificaciones de las concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensor, por ejemplo utilizando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, N.J.). Para descripciones adicionales, véase el Ejemplo 1 y Jonsson, U., y col. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51: 19-26; Jonsson, U., y col. (1991) *Biotechniques* 11: 620-627; Johnsson, B., y col. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8: 125-131; y Johnsson, B., y col. (1991) *Anal. Biochem.* 198: 268-277.

45 El término " k_{on} ", como se utiliza en el presente documento, se pretende que se refiera a la constante de asociación o de velocidad *on*, o velocidad de reacción específica de la reacción en progreso, o formadora de complejo, medida en unidades: $M^{-1}sec^{-1}$.

50 El término " k_{off} ", como se utiliza en el presente documento, se pretende que se refiera a la constante de disociación o de velocidad *off*, o velocidad de reacción específica, para la disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno, medida en unidades: sec^{-1} .

55 El término " K_d ", como se utiliza en el presente documento, se pretende que se refiera a la constante de disociación de una interacción anticuerpo- antígeno particular. Se calcula mediante la fórmula:

$$k_{off}/k_{on} = K_d$$

Los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos de alta potencia que en general muestran bajos valores de k_{off} . Para los fines de la presente divulgación, la expresión “alta potencia” se refiere a una potencia que refleja una CI_{50} baja (o concentración eficaz que muestra una reducción del 50 % en la incorporación de 3H timidina en el bioensayo descrito más abajo). Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden ser neutralizantes (provocando la destrucción de la especie diana, tal como IL-1 β). Un anticuerpo no neutralizante para un uso puede ser neutralizante para un uso distinto.

La expresión “molécula de ácido nucleico”, como se utiliza en el presente documento, se pretende que incluya moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es ADN bicatenario.

La expresión “molécula de ácido nucleico aislada”, como se utiliza en el presente documento en referencia a ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o porciones de anticuerpos (por ejemplo, VH, VL, CDR3) que se unen a IL-1 β humana, se pretende que se refiera a una molécula de ácido nucleico en la cual las secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo o porción de anticuerpo están libres de otras secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos o porciones de anticuerpos que se unen a antígenos distintos a IL-1 β humana, cuyas otras secuencias pueden flanquear de forma natural al ácido nucleico en el ADN genómico de ser humano. Por lo tanto, por ejemplo, un ácido nucleico aislado de la invención que codifica una región VH de un anticuerpo anti IL-1 β humana no contiene otras secuencias que codifican otras regiones VH que se unen a antígenos distintos de IL-1 β humana.

La expresión “desamidado o desamidación” se refiere a la degradación de restos de Asn o Gln en una proteína/péptido (Robinson, y col. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 12409-12413). Por ejemplo, la ruta intramolecular para la desamidación de la asparragina es a través de la formación intermedia de succinimida, lo que da como resultado una mezcla de restos aspartilo e isoaspartilo (Harris, y col. (2001) J. of Chromatography 752: 233-245). La desamidación puede conducir a una reducción de la estabilidad y/o la reducción o pérdida de actividad de la proteína. La desamidación puede producirse *ex vivo* durante la preparación del producto terapéutico formulado, impactando de forma negativa en la fabricación y el almacenamiento del agente farmacéutico. Además, la desamidación puede producirse *in vivo* afectando la eficacia del anticuerpo y la duración de la acción.

El término “vector”, como se utiliza en el presente documento, se pretende que se refiera a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha ligado. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que se pueden ligar en el genoma viral segmentos de ADN adicionales.

La expresión “célula hospedadora recombinante” (o simplemente “célula hospedadora”), como se utiliza en el presente documento, se pretende que se refiera a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante.

Se ha encontrado que un sitio de desamidación en la región CDR2 de la cadena pesada de Mu007 influye en las propiedades biológicas de los anticuerpos humanizados que contienen esta región CDR2 (véase la solicitud de patente provisional de Estados Unidos 60/361423). Los análogos de anticuerpos humanizados que ralentizan o eliminan la desamidación, dan como resultado un anticuerpo con estabilidad mejorada. Por lo tanto, la invención incluye anticuerpos en los que se elimina mediante cambios específicos de sitio la desamidación en la posición Asn55 de la región determinante de complementariedad 2 de cadena pesada (HCDR2).

Los anticuerpos o porciones de unión a antígeno del mismo preferentes de la presente invención, en general muestran afinidad mejorada (valores de K_d bajos) y tienen especificidad de unión y potencia similares a las observadas para Mu007, y en los que se elimina la desamidación en la posición Asn55 de HCDR2. Las propiedades que definen a los anticuerpos de la presente invención se hallan principalmente en las regiones variables del anticuerpo, de forma más específica, en las regiones CDR del anticuerpo.

El motivo principal para la humanización de anticuerpos de otras especies es reducir la posibilidad de que el anticuerpo provoque una respuesta inmunitaria cuando se inyecte como un producto terapéutico en un paciente humano. Cuantas más secuencias de ser humano se empleen en un anticuerpo humanizado, menor es el riesgo de inmunogenicidad. Además, en general los anticuerpos humanizados inyectados tienen una semivida más larga en la circulación que los anticuerpos inyectados que no son de ser humano. Además, si se desea función efectora, debido a que la porción efectora es de ser humano, puede interactuar mejor con los otros componentes del sistema inmunitario del ser humano. Se pueden hacer cambios en las secuencias descritas en el presente documento, como las regiones de las cadenas pesada y ligera preferentes, sin afectar de forma significativa las propiedades biológicas del anticuerpo. Esto es especialmente cierto para las regiones constantes del anticuerpo y las partes de las regiones variables que no influyen en la capacidad de las CDR para unirse a IL-1 β .

Además, como se discute en el presente documento, se pueden utilizar en la presente invención las regiones variables del armazón de ser humano y las variantes de las mismas. Sin embargo, independientemente del armazón elegido, si es un objetivo reducir el riesgo de inmunogenicidad, los números de cambios con respecto al armazón de ser humano elegido deberían minimizarse.

Los restos del armazón de la región variable de cadena pesada y ligera se pueden obtener de las mismas o de distintas secuencias de anticuerpo de ser humano. Las secuencias de anticuerpo de ser humano pueden ser las secuencias de anticuerpos de ser humano de origen natural o pueden ser secuencias consenso de varios anticuerpos de ser humano. Las secuencias del armazón de ser humano preferentes para la región variable de la cadena pesada de los anticuerpos humanizados de la presente invención incluyen el segmento de VH DP-5 (Tomlinson, y col. (1992) J. Mol. Biol. 227: 776-798) y el segmento de J JH4, JH1 o JH5 (Ravetch, y col. (1981) Cell 27: 583-591). El segmento de Vk L1 (Cox, y col. (1994) Eur. J. Immunol. 24: 827-836) y el segmento de J Jk4 (Hieter, y col. (1982) J. Biol. Chem. 10: 1516-1522) son secuencias preferentes para proporcionar el armazón para la región variable de la cadena ligera humanizada.

- 5
- 10 Las secuencias de polinucleótidos de la región constante de la cadena pesada de ser humano preferentes, de los anticuerpos humanizados de la presente invención, incluyen la región constante de IgG 1 o la región constante de IgG4:

**tccaccaagggcccatcggtcttcccgttagcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgctgtgcaaggactacttcccga
aaccgggtgacgggtgctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgacaccttcccggctgctctacagtcctcaggacttactcctcagcagcgtg
gtgaccgtgcccctccagcagcttgggacccagacctacatctgcaactgcaatcacaagcccagcaacccaagggtggacaagaagtggagcccaaa
tcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagcttctccttcccccaaaaaccaggacaccctcatg
atctcccggaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagtcaactggtacgtggagggcgtggaggtgcata
atgcaagacaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgaccaggactggctgaatggcaaggag
tacaagtgaaggctccaacaaa gcctcccagccccatcgagaaaacctctcaaagccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctg
ccccatcccgggacgagctgaccaagaaccaggctgacctgctggctcaaggcttctatcccagcagacatcggctggagtgaggagagcaat
gggcagccggagaacaactacaagaccacgccccctgctgactccgacggctccttctctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtgg
cagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagccttccctgtctccgggtaaatga
IgG1 [SEQ ID NO: 65]**

**ctagcgcctgctccaggagcacctccgagagcacagccgccctgggctgctgtgcaaggactacttcccgaaccgggtgacgggtgctggaactca
ggcggcctgaccagcggcgtgacaccttcccggctgctctacagtcctcaggacttactcctcagcagcgtggtgacogtgcctccagcagcttggg
cacgaagacctacactgcaactgatgacacaagcccagcaacaccaagggtggacaagagaggtgagtcctcaaatatggtccccatgcccaccctgccc
agcacctgagttcttgggggacatcagttcttcttcccccaaaaaccaaggacacttctatgactcccggaccccaggtgacgtgctggtggtg
ggactgagccaggaagaccccgaaggctcagttcaactggtacgtggtgaggtggaggtgcataatgcaagacaagccgcccggaggagcagttca
acagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgaccagactggctgaaaggcagaggagtagcaactgcaaccctgccccatcccaggga
ctccatcgagaaaacctctcaaagccaaaggcagccccgagagccacaggtgtacaccctgccccatcccagggaaggatgacaaagaaccagg
tcagctgacctgctgcaaaaggcttctaccccagcagacatcggcgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgctc
ccgtgctgactccgacggctccttctctctacagcaggtaaccgtggacaagagcaggtggcaggagggggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatg
aggctctgcacaaccactacacacagaagaccttccctgtctctgggtaaat
IgG4 [SEQ ID NO: 66].**

- 15 La secuencia de polinucleótido de la región constante de la cadena ligera de ser humano preferente de los anticuerpos humanizados de la presente invención es la región constante de la cadena kappa:

**cgaactgtggctgcaccatctgtcttctatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgccttctgtgtgctgctgaataacttctatcccagag
aggccaaagtacagtggaagggtggataaccccctcaatcgggtaactcccaggagaggtgcacagagcagcagcaaggacagcaccctacagcctc
agcagcaccctgacgtgagcaagcagactacgagaacacaaggtctacgcctgcaagtcacccatcagggcctgagctcggcgtcacaagag
cttcaacaggggagagtctaa
[SEQ ID NO: 67]**

- 20 Los anticuerpos preferentes de la presente invención contienen la región constante de la cadena pesada de IgG1 [SEQ ID NO: 65] o la región constante de la cadena pesada de IgG4 [SEQ ID NO: 66] y la región constante de la cadena ligera kappa [SEQ ID NO: 67], y se designan mediante el clon especificado en la Tabla 2 (es decir, W13, W17, etc.). Las secuencias de polinucleótidos de la región variable para los anticuerpos W13, W17, W18, W20 y U43 de la presente invención incluyen:

Cadena pesada de W13

**ggatccactggctcagggtcagctggctcagctggcgtgaggtgaaagaagcctgctcctcctgaaaggtctcctgcaaggcttctggctacacattcgcac
cgctatggatcgagtggtgctgccaggccccctggccaaggcctggagtggtggcagattctgctggcagcggcagacattaactacaatgagaagt
tcaaggccgcgtcagattaccgagcaaatccacgagcacagcctacatggagctgagcagcctgctgctgagacacggcgtgtattactgtgc
gcgcatgtactatgattaccagcaggccttggactactggggccaggcaccctggcaccgtcctcctcctccaccaaggcccatggcttcccgtc
agc
[SEQ ID NO: 55]**

Cadena ligera de W13

gacatccagatgaccagctcctccctgctgcatctgtggcgaccgctcaccatcactgtaagttcagtcaggacattgatcgcttcctgacctg
gttcagcagaaaccaggcaagcccctaagtcctgatctatcgctgaagcgctggtggatggcgtcccacccgcttcagcggcagtggtctggca
cagattcactctcaccatcagcagcctgacgctgaagattttgcaacttattactgcatccagatgatgagttccgtacaccttcggcggcgccaccaag
gtggagatcaaa

[SEQ ID NO: 60]

Cadena pesada de W17

ggatccactggtcaggtgagctggtgagctgtggcgctgaggtgaagaagcctggctcctccgtgaaggtcctcgaaggcttctggctacacattcgac
cgctattggatcgagtggtgctgccaggcccctggccaaggcctggagtggtggcgagattctgctggcagcggcgacattaactacaatgagaagt
tcaaggcgctcagcattaccgaggcaaatccacgagcagcctacatggagctgagcagcctgctgaggacacggcctgtattactgtgc
gcgatgtactatgattacgaccagggtttgacctgtggggccaggcaccctggtcaccgtcctcctccgctccaccaaggccatcggcttcccgt
agc

[SEQ ID NO: 56]

5 Cadena ligera de W17

gacatccagatgaccagctcctccctgctgcatctgtggcgaccgctcaccatcactgtaagttcagtcaggacattgatcgcttcctgagctg
gttcagcagaaaccaggcaagcccctaagtcctgatctatcgctgaagcgctggtggatggcgtcccacccgcttcagcggcagtggtctggca
cagattcactctcaccatcagcagcctgacgctgaagattttgcaacttattactgcttcagatgatgagttccgtacgggttcggcggcgccaccaag
tggagatcaaa

[SEQ ID NO: 61]

Cadena pesada de W18

ggatccactggtcaggtgagctggtgagctgtggcgctgaggtgaagaagcctggctcctccgtgaaggtcctcgaaggcttctggctacacattcgac
cgctattggatcgagtggtgctgccaggcccctggccaaggcctggagtggtggcgagattctgctggcagcggcgacattaactacaatgagaagt
tcaaggcgctcagcattaccgaggcaaatccacgagcagcctacatggagctgagcagcctgctgaggacacggcctgtattactgtgc
gcgatgtactatgattacgaccagggtttgacaactggggccaggcaccctggtcaccgtcctcctccgctccaccaaggccatcggcttcccgt
agc

[SEQ ID NO: 57]

Cadena ligera de W18

10 gacatccagatgaccagctcctccctgctgcatctgtggcgaccgctcaccatcactgtaagttcagtcaggacattgatcgcttcctgagctg
gttcagcagaaaccaggcaagcccctaagtcctgatctatcgctgaagcgctggtggatggcgtcccacccgcttcagcggcagtggtctggca
cagattcactctcaccatcagcagcctgacgctgaagattttgcaacttattactgcttcagatgatgagttccgtacaccttcggcggcgccaccaag
tggagatcaaa

[SEQ ID NO: 62]

Cadena pesada de W20

ggatccactggtcaggtgagctggtgagctgtggcgctgaggtgaagaagcctggctcctccgtgaaggtcctcgaaggcttctggctacacattcgac
cgctattggatcgagtggtgctgccaggcccctggccaaggcctggagtggtggcgagattctgctggcagcggcgacattaactacaatgagaagt
tcaaggcgctcagcattaccgaggcaaatccacgagcagcctacatggagctgagcagcctgctgaggacacggcctgtattactgtgc
gcgatgtactatgattacgaccagggtttgactactggggccaggcaccctggtcaccgtcctcctccgctccaccaaggccatcggcttcccgt
agc

[SEQ ID NO: 59]

Cadena ligera de W20

15 gacatccagatgaccagctcctccctgctgcatctgtggcgaccgctcaccatcactgtaagttcagtcaggacattgatcgcttcctgagctg
gttcagcagaaaccaggcaagcccctaagtcctgatctatcgctgaagcgctggtggatggcgtcccacccgcttcagcggcagtggtctggca
cagattcactctcaccatcagcagcctgacgctgaagattttgcaacttattactgcttcagatgatgagttccgtacaccttcggcggcgccaccaag
tggagatcaaa

[SEQ ID NO: 63]

Cadena pesada de U43

**ggatccactgggtcaggtgcagctgggtgcagctctggcgctgaggtgaagaagcctggctcctcctgaaaggtctcctgcaaggcttctggctacacattcgac
cgctattggatcgagtggtgctgccaggccctggccaaggcctggagtgatggcgagattctgcctggcagcggcgacattaactacaatgagaagt
tcaagggccgcgtcacgattaccgggacaaatccacgagcagcctacatggagctgagcagcctgcctctgaggacacggcctgtattactgtgc
gcgcatgtactatgattacgaccagggttagcctgtggggccagggcacctgtcaccgtctcctccgctccaccaagggccatcggcttcccgcgt
agc
[SEQ ID NO: 58]**

Cadena ligera de U43

**gacatccagatgaccagctctccatctccctgtctgcatctgtggcgacccgctcaccatcactgtaaggcgagtcaggacattgatccttcctgagct
ggttcagcagaaccaggcaaaagccctaaagtcctgatctatcgcgtgaagcgcctgggtggatggcgtccatcccgttcagcggcagtggtctggtc
acagattcactctcaccatcagcagcctgagcctgaagattttgcaacttactgcgttcagatgatgagttccgtacacctcggcggcgccaag
gtggagatcaaa
[SEQ ID NO: 64]**

- 5 En otra realización, las secuencias de aminoácidos maduras de los anticuerpos de la presente invención, W13, W17, W18, W20 y U43 incluyen:

Cadena pesada de W13

**QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFD RYWIEWVRQA PGQGLEWMGE ILPGSGDINY
NEKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARMY YDYDQGFYDW GQGTLVTVSS
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKEVEP KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG
PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVDVVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LQSDGTSFLLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
[SEQ ID NO: 45]**

Cadena ligera de W 13

**DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCKFSQDID RFLTWFQKP GKAPKSLIYR VKRLVDGVPS
RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCIQ YDEFPYTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP**

**SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEN
[SEQ ID NO: 46]**

10

Cadena pesada de IgG1 de W17

**QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFD RYWIEWVRQA PGQGLEWMGE ILPGSGDINY
NEKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARMY YDYDQGFYDW GQGTLVTVSS
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKEVEP KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG
PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVDVVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LQSDGTSFLLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
[SEQ ID NO: 47]**

Cadena pesada de IgG4 de W17

**QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFDRYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGDINYNEKF
KGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARMYYDYDQGFYDWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP
PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTKTYTCNVNDRKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCV
VDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGTSFLLYSLRVTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK
[SEQ ID NO: 68]**

Cadena ligera de W17

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKFSQDID RFLSWFQQKP GKAPKSLIYR VKRLVDGVPS
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCVQ YDEFFPYGFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP
SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSSTLT
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
[SEQ ID NO: 48]

Cadena pesada de W18

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFD RYWIEWVRQA PGQGLEWMGE ILPGSGTINY
NEKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARMY YDYDQGFNDW GQGTLVTVSS
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKEP KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG
PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE
LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LQSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFCSSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
[SEQ ID NO: 49]

5 Cadena ligera de W 18

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKFSQDID RFLSWFQQKP GKAPKSLIYR VKRLVDGVPS
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCVQ YDEFFPYTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP
SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSSTLT
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGE
[SEQ ID NO: 50]

Cadena pesada de W20

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFD RYWIEWVRQA PGQGLEWMGE ILPGSGDINY
NEKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARMY YDYDQGFNDW GQGTLVTVSS
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKEP KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG

PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE
LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LQSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFCSSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
[SEQ ID NO: 51]

10 Cadena ligera de W20

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKFSQDID RFLSWFQQKP GKAPKSLIYR VKRLVDGVPS
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCVQ YDEFFPYTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP
SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSSTLT
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
[SEQ ID NO: 52]

Cadena pesada de U43

**QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFD RYWIEWVRQA PGQGLEWMGE ILPGSGDINY
NEKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARMY YDYDQGFSLW GQGTLVTVSS
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKEVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
STYRVVSVLT VHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE
LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LQSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFCSSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK .**
[SEQ ID NO: 53]

Cadena ligera de U43

**DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCKASQDID RFLSWFQQKP GKAPKSLIYR
VKRLVDGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCVQ YDEFPYTFGG
GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEC**
[SEQ ID NO: 54]

- 5 La presente invención abarca anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos que hacen uso de una o más de CDR1, CDR2, o CDR3 de cadena ligera, o CDR1 de cadena pesada, [SEQ ID NO: 1-4], del anticuerpo Mu007. Las CDR que abarcada la presente invención son las regiones hipervariables del anticuerpo Mu007 que proporcionan la mayoría de los restos de contacto para la unión del anticuerpo a un epítipo de IL-1 β específico. Por lo tanto, las CDR descritas en el presente documento pueden utilizarse para fabricar anticuerpos de longitud completa, así como fragmentos funcionales y análogos, u otras proteínas, que cuando se unen a las CDR mantienen a las CDR en una conformación estructural activa, de modo que la afinidad de unión de la proteína que emplea las CDR es específica por IL-1 β madura.

- 15 La afinidad de unión del anticuerpo Mu007 se determinó utilizando resonancia de plasmón superficial (BIAcore™) [véase el Ejemplo 1]. En estos experimentos el anticuerpo se capturó a densidad baja en un chip de BIAcore™ mediante proteína A o anticuerpo anti Fc, y el ligando se hizo pasar. Se midió la masa acumulada en la superficie del chip. Este procedimiento analítico permite la determinación en tiempo real de las velocidades *on* y *off* para obtener la de afinidad (K_d) de unión. El anticuerpo Mu007 tiene una K_d de aproximadamente 6,2 pM (picomolar). Los anticuerpos humanizados preferentes de la presente invención, es decir, W13, W17, W18, W20, y U43, tenían K_d de aproximadamente 2,8 pM, 2,8 pM, 4,2 pM, 2,7 pM, y 4,7 pM, respectivamente (véanse Ejemplo 1, la Tabla 3).

- 20 También es preferente que los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos de la presente invención se unan de forma específica a IL-1 β y no a otros miembros de la familia IL-1 o a proteínas estructuralmente relacionadas dentro de la misma especie.

- 25 También es preferente que los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos de la presente invención neutralicen la actividad biológica de IL-1 β . Se utilizaron dos ensayos distintos para analizar la capacidad de Mu007 y de los anticuerpos preferentes de la presente invención para neutralizar la actividad de IL-1 β [véanse los Ejemplos 2 y 3].

- 30 En este primer ensayo se utilizó una línea celular murina, T1165.17, que necesita bajos niveles de IL-1 β para proliferación. IL-1 β humana estaba presente a un nivel constante en el medio y se añadió una serie de dilución de cada anticuerpo. La inhibición de la proliferación proporcionó una medida de la capacidad del anticuerpo para bloquear la activación de IL-1 β del receptor de IL-1. Las medidas de proliferación para distintas concentraciones del anticuerpo dieron como resultado un valor de CI_{50} promedio de 20,6 pM para Mu007 y 1,2 pM para W13, 1,8 pM para W17, 2,0 pM para W18, y 4,0 pM para U43, respectivamente (véanse Ejemplo 2, la Tabla 4).

- 35 Es preferente que los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos de la presente invención tengan un valor de CI_{50} que sea menor que el de Mu007. La " CI_{50} " al que se hace referencia en el presente documento es la medida de la potencia de un anticuerpo para inhibir la actividad de IL-1 β humana. La CI_{50} es la concentración de anticuerpo que da como resultado el 50 % de inhibición de IL-1 β en un experimento de dosis única. La CI_{50} se puede medir mediante cualquier ensayo que detecte inhibición de la actividad de IL-1 β humana. Sin embargo, los valores de la CI_{50} obtenidos pueden variar según el ensayo utilizado. Incluso puede haber alguna variabilidad entre experimentos que utilizan el mismo ensayo. Por ejemplo, el estado de las células dependientes de IL-1 β discutidas en el presente documento, tiene un efecto sobre los valores de la CI_{50} obtenidos. Por lo tanto, el valor crítico para los fines de la presente invención es un valor con respecto al obtenido utilizando Mu007 o a los anticuerpos de la presente invención, en un experimento único.

El segundo ensayo utilizado es un ensayo de neutralización de IL-6. Ni Mu007 ni los anticuerpos preferentes de la presente invención tienen reacción cruzada con IL-1 β de ratón, haciendo difícil el uso de un modelo de ratón para analizar la actividad neutralizante *in vivo*. Sin embargo, una consecuencia de la actividad proinflamatoria de IL-1 β es la inducción de IL-6, otra citocina proinflamatoria que media algunos de los efectos no locales de IL-1 β . IL-1 β humana es capaz de unirse y estimular al receptor de IL-1 β de ratón, conduciendo a una elevación de IL-6 de ratón. Por lo tanto, un anticuerpo con actividad neutralizante podría bloquear la inducción de IL-6 en un ratón al que se proporcionó una dosis de IL-1 β humana. Mu007 y los anticuerpos de la presente invención demostraron potente neutralización de IL-1 β humana en el modelo murino de estimulación inflamatoria (véase el Ejemplo 3).

La presente invención también está dirigida a ADN recombinante que codifica anticuerpos que, cuando se expresan, se unen de forma específica a IL-1 β humana. Preferentemente, el ADN codifica anticuerpos que, cuando se expresan, comprenden una o más de las CDR de la cadena pesada y ligera de Mu007 [SEQ ID NO: 1-6], y una o más de las CDR de cadena pesada y ligera de la presente invención [SEQ ID NO: 7-42]. Las secuencias de ADN ejemplares que, en expresión, codifican las cadenas de polipéptidos que comprenden las regiones variables de la cadena pesada de los anticuerpos preferentes de la presente invención, están representadas como las SEQ ID NO: 55-59. Las secuencias de ADN ejemplares que, en expresión, codifican las cadenas de polipéptidos que comprenden las regiones variables de la cadena ligera de los anticuerpos preferentes de la presente invención, están representadas como las SEQ ID NO: 60-64.

Los anticuerpos neutralizantes de la presente invención se consiguen a través de la generación de secuencias génicas de anticuerpo apropiadas, es decir, secuencias de aminoácidos, mediante la disposición de las secuencias de nucleótidos apropiadas y la expresión de estas en una línea celular adecuada. Se puede producir cualquiera de las secuencias de nucleótidos deseadas utilizando el procedimiento de "mutagénesis basada en codón", como se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 5.264.563 y 5.523.388. Tales procedimientos permiten la producción de cualquiera y todas las frecuencias de restos de aminoácidos en cualquiera de las posiciones de codón deseadas dentro de un oligonucleótido. Esto puede incluir sustituciones completamente aleatorias de cualquiera de los 20 aminoácidos en una posición deseada. Como alternativa, este procedimiento se puede llevar a cabo de forma tal que se consiga un aminoácido particular en un emplazamiento deseado dentro de una cadena de aminoácidos, tal como las secuencias de CDR nuevas de acuerdo con la invención. En resumen, se puede conseguir fácilmente la secuencia de nucleótidos apropiada para expresar cualquier secuencia de aminoácidos deseada y, utilizando tales procedimientos, se pueden reproducir las secuencias de CDR nuevas de la presente invención. Esto da como resultado la capacidad de sintetizar polipéptidos, tales como anticuerpos, con cualquiera de las secuencias de aminoácidos deseadas. Por ejemplo, es posible ahora determinar las secuencias de aminoácidos de cualquiera de los dominios deseados de un anticuerpo de elección y, de forma opcional, preparar cadenas homólogas con uno o más aminoácidos reemplazados por otros aminoácidos deseados, de modo que se proporciona una variedad de análogos sustituidos.

En la aplicación de tales procedimientos, debe apreciarse que debido a la degeneración del código genético, tales procedimientos, como la síntesis aleatoria de oligonucleótidos y la síntesis parcial de oligonucleótidos degenerados, incorporarán redundancias para los codones que especifican un resto de aminoácido particular en una posición particular, a pesar de que tales procedimientos se pueden utilizar para proporcionar un conjunto maestro de todas las posibles secuencias de aminoácidos y la exploración de la función óptima como estructuras de anticuerpo de estas, o para otros fines. Tales procedimientos se describen en Cwirla y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 6378-6382 (1990) y Devlin y col., Science 249: 404-406 (1990). Como alternativa, tales secuencias de anticuerpos se pueden sintetizar de forma química o generar de otros modos bien conocidos para los expertos en la materia.

De acuerdo con la invención desvelada en el presente documento, se pueden generar anticuerpos de alta potencia potenciados mediante la combinación de una o más secuencias de CDR nuevas en una única estructura de polipéptido, como se desvela en el presente documento, cada una habiendo demostrado de forma independiente dar como resultado una potencia o actividad biológica potenciadas y desamidación reducida. De esta manera, se pueden combinar en un anticuerpo varias secuencias de aminoácido nuevas, en las mismas o distintas CDR, para producir anticuerpos con los niveles de actividad biológica deseados. Tales niveles deseados a menudo derivan de la producción de anticuerpos cuyos valores de k_{off} son preferentemente de menos de $10^{-3} s^{-1}$, más preferentemente de menos de $5 \times 10^{-4} s^{-1}$, e incluso más preferentemente de menos de $1 \times 10^{-4} s^{-1}$. Por medio de un ejemplo no limitante, se pueden utilizar 36 de tales secuencias de CDR nuevas [SEQ ID NO: 7-42] y se puede explorar la potencia o la actividad biológica en los anticuerpos resultantes, utilizando el bioensayo de células T1165.17 o el protocolo de neutralización de IL-1 β humana descritos en el presente documento, en donde el anticuerpo demuestra alta afinidad por una estructura antigénica particular, tal como IL-1 β humana. Por lo tanto el resultado global sería un procedimiento iterativo de combinación de diversas sustituciones de aminoácidos únicas y la exploración de la afinidad antigénica y la potencia de los anticuerpos resultantes, de una manera "etapa por etapa", asegurando de este modo que la potencia se aumenta sin sacrificar una afinidad a ser posible alta, o por lo menos un valor mínimo de afinidad. Este procedimiento iterativo se puede utilizar para generar reemplazos de aminoácido dobles o triples en un procedimiento por etapas, de modo que se estrecha la búsqueda de anticuerpos que tengan mayor afinidad (véanse los documentos WO 01/64751 y US 2002/0098189). Como consecuencia, los aminoácidos de cada región CDR del anticuerpo Mu007 se sustituyeron de forma sistemática y se exploró la afinidad antigénica en los anticuerpos resultantes. Se determinó que las sustituciones de aminoácidos en cualquier posición en la CDR2 de cadena ligera no dio como resultado, en general, un aumento en la afinidad del anticuerpo. Por lo tanto, una CDR2

de cadena ligera de la presente invención es preferentemente la secuencia de CDR2 de cadena ligera de Mu007 [SEQ ID NO: 2], debido a que las sustituciones de aminoácidos en esta CDR no dieron como resultado anticuerpos de mayor afinidad.

5 A la inversa, hay que considerar que no todos los emplazamientos dentro de las secuencias de los distintos dominios de anticuerpo pueden ser iguales en que las sustituciones de cualquier tipo en un emplazamiento particular pueden ser útiles o perjudiciales. Además, las sustituciones de determinados tipos de aminoácidos en determinados emplazamientos pueden, asimismo, ser una ventaja o un inconveniente con respecto a la afinidad. Por ejemplo, puede no ser necesario probar todos los posibles aminoácidos hidrófobos en una posición dada. Puede ser que cualquier aminoácido hidrófobo también lo haga. Por otro lado, un aminoácido ácido o básico en un emplazamiento
10 dado puede proporcionar grandes variaciones en la afinidad medida.

Como ya se ha descrito, K_d se mide por la proporción de las constantes k_{on} y k_{off} . Por ejemplo, una k_{on} de $3,1 \times 10^7$ ($M^{-1}s^{-1}$) y una k_{off} de $0,9 \times 10^{-4}$ (s^{-1}) se combinarían para proporcionar una K_d de $2,9 \times 10^{-12}$ M. Por lo tanto, la afinidad se puede mejorar por el aumento de la k_{on} o la disminución de la k_{off} . Por consiguiente, una disminución de la k_{off} de los anticuerpos de la presente invención probablemente daría como resultado un agente terapéutico más
15 eficaz.

De acuerdo con la presente invención, la potencia aumentada de un anticuerpo existente, independientemente de su afinidad antigénica, se consigue a través de cambios selectivos de uno o más de los aminoácidos presentes en una o más regiones CDR de dichos anticuerpos, con lo cual dichos cambios de aminoácidos tienen el efecto de producir una disminución de la k_{off} de dicho anticuerpo, preferentemente con un aumento en la afinidad del anticuerpo. Se
20 puede conseguir mayor potencia con un valor de k_{off} menor, incluso si la afinidad se mantiene igual o se reduce algo. Tal anticuerpo se produce de forma más ventajosa mediante la síntesis de las cadenas de polipéptidos necesarias a través de la síntesis en células modificadas por ingeniería genética adecuadas que tienen incorporadas en ellas las secuencias de nucleótidos apropiadas que codifican las cadenas de polipéptidos necesarias que contienen los segmentos de CDR alterados. También, de acuerdo con la presente invención, se puede preparar *de novo* un anticuerpo nuevo que tenga un nivel de potencia o actividad biológica conveniente, mediante la incorporación de aminoácidos seleccionados en emplazamientos seleccionados dentro de las regiones CDR de dichas cadenas de polipéptidos del anticuerpo utilizando células modificadas por ingeniería genética como se describe en el presente documento, o íntegramente a través de síntesis química de las cadenas de polipéptidos necesarias con la formación posterior de los enlaces disulfuro necesarios.
25

De acuerdo con lo anterior, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos monoclonales de alta potencia. Tales anticuerpos, sin embargo, son monoclonales solamente en el sentido de que se pueden obtener a partir de un clon de un tipo celular único. Sin embargo, esto no significa su limitación a un origen particular. Tales anticuerpos pueden producirse fácilmente en células que comúnmente no producen anticuerpos, tales como células CHO, NSO, o COS. Además, tales anticuerpos se pueden producir en otros tipos de células, especialmente de mamífero e
35 incluso células vegetales, mediante la modificación por ingeniería genética de tales células para expresar y ensamblar las cadenas de polipéptido ligera y pesada que forman el producto de anticuerpo. Además, tales cadenas se pueden sintetizar de forma química pero, debido a que podrían ser específicas para un determinante antigénico dado, constituirían aún anticuerpos "monoclonales" dentro del espíritu en el que se utiliza el término. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, la expresión anticuerpo monoclonal se pretende que indique más la especificidad y la pureza de las moléculas de anticuerpo que el mero mecanismo utilizado para la producción de dichos anticuerpos.
40

También, como se usa en el presente documento, el término potencia se pretende que describa la dependencia del efecto del anticuerpo, cuando se utiliza para su fin terapéutico pretendido, de la concentración de tal anticuerpo. Por lo tanto, potencia significa actividad biológica con respecto a un antígeno dado. Por medio de un ejemplo no limitante, la potencia, o actividad biológica, o efecto biológico, se mide para un anticuerpo anti IL-1 β mediante el bioensayo de células T1165.17 o el protocolo de neutralización de IL-1 β humana, como se describe en el presente documento. A la inversa, la afinidad de un anticuerpo por un antígeno es simplemente una medida matemática de la proporción de k_{on} con respecto a k_{off} . Además, la K_d de los anticuerpos producidos de acuerdo con los procedimientos de la presente invención estará normalmente en el intervalo de 10^{-12} M o menos.
45

En una realización, los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos de la presente invención comprenderán comúnmente una región constante y una región variable de mamífero, preferentemente un ser humano, comprendiendo dicha región variable regiones marco conservadas de las cadena pesada y ligera y las CDR de las cadena pesada y ligera, en las que las regiones marco conservadas de cadena pesada y ligera tienen secuencias características de un anticuerpo de mamífero, preferentemente un anticuerpo de ser humano, y en las que las secuencias de CDR son similares a las de un anticuerpo de alguna especie distinta que un ser humano, preferentemente un ratón. Las secuencias de CDR de Mu007 son como se muestran en Tabla 1.
50
55

Tabla 1		
Secuencias de CDR básicas como se proporciona en las SEQ ID NO: 43 y 44		
CDR	Secuencia	SEQ ID NO.
L1	KASQDIRYLS	1
L2	RVKRLVD	2
L3	LQYDEFPYT	3
H1	GYTFSRYWIE	4
H2	EILPGNGNINYNEKFKG	5
H3	IYYDYDQGFTY	6

5 En consonancia con lo anterior, y para describir mejor las secuencias desveladas de acuerdo con la invención con respecto a un anticuerpo humanizado frente a IL-1 β humana, una secuencia básica o de partida de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de Mu007 se muestran en la región variable de cadena ligera --SEQ ID NO: 43, y la región variable de cadena pesada --SEQ ID NO: 44. También de acuerdo con la invención, se generaron aminoácidos específicos distintos de estas secuencias iniciales mediante procedimientos recombinantes, comenzando con secuencias de nucleótidos preparadas diseñadas para generar dichas secuencias de aminoácidos cuando se expresan en células recombinantes. Los productos de dichas células son los anticuerpos monoclonales de la presente invención, siempre que ningún anticuerpo tenga la combinación de la SEQ ID NO: 1 para la CDR L1, la SEQ ID NO: 2 para la CDR L2, la SEQ ID NO: 3 para la CDR L3, la SEQ ID NO: 4 para la CDR H1, la SEQ ID NO: 5 para la CDR H2, y la SEQ ID NO: 6 para la CDR H3.

15 En una realización de la presente invención, la potencia se aumenta utilizando un fragmento Fab de anticuerpo neutralizante frente a IL-1 β humana que tiene una K_d de por lo menos 10^{11} M, y preferentemente de por lo menos 10^{12} M, mediante la disminución del valor de k_{off} hasta por lo menos 10^{-3} s $^{-1}$, preferentemente por lo menos 5×10^{-4} s $^{-1}$, más preferentemente por lo menos 10^{-4} s $^{-1}$. Los aminoácidos presentes en las CDR de tales fragmentos Fab se muestran en la Tabla 2.

20 La Tabla 2 indica las secuencias de aminoácidos (todas las secuencias en el código de aminoácidos de una letra convencional) de las CDR empleadas en los anticuerpos de la presente invención. En la Tabla 2, los emplazamientos de las sustituciones de aminoácidos clave hechas en las correspondientes CDR de la Tabla 1 (es decir, los emplazamientos en los que las CDR difieren en aminoácidos) se indican en negrita y están subrayados. De forma inicial, los fragmentos Fab se exploraron mediante un ELISA convencional. Los valores de las CI_{50} medidos mediante el ensayo de proliferación de células T1165.17 se indican como una comparación de las variantes de Fab producidas de forma recombinante con un control de tipo silvestre (ts/Fab). Las variantes de Fab y los anticuerpos posteriores de la presente invención, se denominan mediante su nomenclatura de clon de la Tabla 2.

Tabla 2

Secuencias de las CDR que tienden a inducir alta potencia en anticuerpos					
Clon	CDR	Secuencia	SEQ ID NO.	CI_{50} ts/Fab	
U2	L1	KASQDIRYLS	1	3	
	L2	RVKRLVD	2		
	L3	<u>V</u>QYDEFNYT	7		
	H1	GYTFSRYWIE	4		
	H2	EILPG <u>T</u> GTIN <u>T</u> YNEKFKG	8		
	H3	<u>V</u>YYDYD<u>Y</u>G<u>F</u>D<u>Y</u>	9		
U3	L1	KASQDIDRYLS	1	3	

ES 2 567 198 T3

(continuación)

Secuencias de las CDR que tienden a inducir alta potencia en anticuerpos

Clon	CDR	Secuencia	SEQ ID NO.	Cl ₅₀ ts/Fab		
U4	L2	RVKRLVD	2	2		
	L3	<u>V</u> QYDEF <u>N</u> YT	7			
	H1	GYTF <u>D</u> RYWIE	10			
	H2	EILPG <u>T</u> <u>G</u> TINYN <u>E</u> KFKG	8			
	H3	<u>V</u> YYDYD <u>Y</u> G <u>F</u> <u>D</u> L	11			
	L1	KASQDIDRYL <u>T</u>	12			
	L2	RVKRLVD	2			
	L3	<u>V</u> QYDEF <u>N</u> YT	7			
	H1	GYTF <u>D</u> RYWIE	10			
	H2	EILPG <u>T</u> <u>G</u> TINYN <u>E</u> KFKG	8			
U5	H3	<u>V</u> YYDYD <u>Y</u> G <u>F</u> <u>D</u> L	11	0,5		
	L1	KASQDIDRYL <u>T</u>	12			
	L2	RVKRLVD	2			
	L3	<u>I</u> QYDEF <u>N</u> YT	13			
	H1	GYTF <u>S</u> RYWIE	4			
	H2	EILPG <u>T</u> <u>G</u> TINYN <u>E</u> KFKG	8			
U6	H3	<u>V</u> YYDYD <u>Y</u> G <u>F</u> <u>D</u> N	14	3		
	L1	KASQDIDRYL <u>T</u>	12			
	L2	RVKRLVD	2			
	L3	<u>V</u> QYDEF <u>N</u> YT	7			
	H1	GYTF <u>D</u> RYWIE	10			
	H2	EILPG <u>T</u> <u>G</u> TINYN <u>E</u> KFKG	8			
	H3	<u>V</u> YYDYD <u>Y</u> G <u>F</u> <u>D</u> N	14			
	U7	L1	KASQDIDRYL <u>T</u>		12	2
		L2	RVKRLVD		2	
		L3	<u>V</u> QYDEF <u>N</u> YT		7	
H1		GYTF <u>D</u> RYWIE	10			
H2		EILPG <u>T</u> <u>G</u> TINYN <u>E</u> KFKG	8			
H3		<u>V</u> YYDYD <u>Y</u> G <u>F</u> <u>D</u> N	14			
U8	L1	KASQDIDRYL <u>T</u>	12	2		
	L2	RVKRLVD	2			
	L3	<u>I</u> QYDEF <u>P</u> YT	15			
	H1	GYTF <u>D</u> RYWIE	10			
	H2	EILPG <u>S</u> <u>G</u> TINYN <u>E</u> KFKG	16			
	H3	<u>V</u> YYDYD <u>Y</u> G <u>F</u> <u>D</u> N	14			
U9	L1	KASQDIDRYL <u>S</u>	1	2		
	L2	RVKRLVD	2			
	L3	<u>V</u> QYDEF <u>P</u> YT	17			
	H1	GYTF <u>D</u> RYWIE	10			
	H2	EILPG <u>T</u> <u>G</u> <u>D</u> INYN <u>E</u> KFKG	18			
	H3	<u>V</u> YYDYD <u>Y</u> G <u>F</u> <u>T</u> L	19			
U10	L1	KASQDIRYL <u>S</u>	1	0,5		
	L2	RVKRLVD	2			
	L3	<u>V</u> QYDEF <u>P</u> YT	17			
	H1	GYTF <u>S</u> RYWIE	4			
	H2	EILPG <u>T</u> <u>G</u> TINYN <u>E</u> KFKG	8			
	H3	<u>V</u> YYDYD <u>Y</u> G <u>F</u> <u>D</u> N	14			

ES 2 567 198 T3

(continuación)				
Clon	CDR	Secuencia	SEQ ID NO.	Cl ₅₀ ts/Fab
U11	L1	KASQDIRYLS	1	2
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>I</u> QYDEF <u>P</u> Y <u>L</u>	20	
	H1	GYTF <u>D</u> RYWIE	10	
	H2	EILPG <u>T</u> G <u>T</u> I <u>N</u> YNEKFKG	8	
	H3	<u>V</u> YYDY <u>D</u> Y <u>G</u> F <u>D</u> N	14	
U12	L1	KASQDIRYLS	1	5
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>I</u> QYDEF <u>P</u> Y <u>L</u>	20	
	H1	GYTF <u>D</u> RYWIE	10	
	H2	EILPG <u>T</u> G <u>T</u> I <u>N</u> YNEKFKG	8	
	H3	<u>V</u> YYDY <u>D</u> Y <u>G</u> F <u>D</u> N	14	
U13	L1	KASQDIRYLS	1	4
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>I</u> QYDEF <u>N</u> Y <u>T</u>	13	
	H1	GYTF <u>D</u> RYWIE	10	
	H2	EILPG <u>S</u> G <u>D</u> I <u>N</u> YNEKFKG	21	
	H3	<u>V</u> YYDY <u>D</u> Y <u>G</u> F <u>D</u> N	14	
U14	L1	KASQDIRYLS	1	3
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>I</u> QYDEF <u>N</u> Y <u>T</u>	13	
	H1	GYTF <u>D</u> RYWIE	10	
	H2	EILPG <u>S</u> G <u>D</u> I <u>N</u> YNEKFKG	21	
	H3	<u>V</u> YYDY <u>D</u> Y <u>G</u> F <u>D</u> N	14	
U15	L1	KASQDIDRYL <u>T</u>	12	2
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>I</u> QYDEF <u>P</u> Y <u>T</u>	15	
	H1	GYTF <u>D</u> RYWIE	10	
	H2	EILPG <u>T</u> G <u>T</u> I <u>N</u> YNEKFKG	8	
	H3	<u>V</u> YYDY <u>D</u> Y <u>G</u> F <u>D</u> Y	9	
U16	L1	KASQDIDRYL <u>T</u>	12	0,5
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>I</u> QYDEF <u>N</u> Y <u>T</u>	13	
	H1	GYTF <u>S</u> RYWIE	4	
	H2	EILPG <u>S</u> G <u>T</u> I <u>N</u> YNEKFKG	16	
	H3	<u>V</u> YYDY <u>D</u> Y <u>G</u> F <u>D</u> N	14	
U17	L1	KASQDIDRYL <u>T</u>	12	1
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>I</u> QYDEF <u>P</u> Y <u>T</u>	15	
	H1	GYTF <u>D</u> RYWIE	10	
	H2	EILPG <u>T</u> G <u>T</u> I <u>N</u> YNEKFKG	8	
	H3	<u>V</u> YYDY <u>D</u> Y <u>G</u> F <u>D</u> Y	9	
U18	L1	KASQDIDRYL <u>T</u>	12	2
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	IQYDEFNYT	13	
	H1	GYTF <u>S</u> RYWIE	4	
	H2	EILPG <u>S</u> G <u>T</u> I <u>N</u> YNEKFKG	16	
	H3	<u>V</u> YYDY <u>D</u> Y <u>G</u> F <u>D</u> N	14	
U19	L1	KASQDIDRYL <u>T</u>	12	2
	L2	RVKRLVD	2	

ES 2 567 198 T3

(continuación)				
Clon	CDR	Secuencia	SEQ ID NO.	Cl ₅₀ ts/Fab
U20	L3	<u>V</u> QYDEF <u>P</u> Y <u>T</u>	17	2
	H1	GYTFSRYWIE	4	
	H2	EILPGT <u>G</u> DIN <u>Y</u> NEKFKG	18	
	H3	<u>V</u> YYDYD <u>Y</u> GFD <u>N</u>	14	
	L1	KASQDIRYLS	1	
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>V</u> QYDEF <u>P</u> Y <u>T</u>	17	
	H1	GYTFSRYWIE	4	
	H2	EILPG <u>S</u> G <u>D</u> IN <u>Y</u> NEKFKG	21	
U21	H3	<u>V</u> YYDYD <u>Y</u> GFD <u>Y</u>	9	2
	L1	KASQDIDRYL <u>T</u>	12	
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>V</u> QYDEF <u>P</u> Y <u>T</u>	17	
	H1	GYTFSRYWIE	4	
	H2	EILPGT <u>G</u> DIN <u>Y</u> NEKFKG	18	
	H3	<u>V</u> YYDYD <u>Y</u> GFD <u>N</u>	14	
	L1	KASQDIRYLS	1	
	L2	RVKRLVD	2	
U22	L3	<u>I</u> QYDEF <u>N</u> Y <u>T</u>	13	2
	H1	GYTF <u>D</u> RYWIE	10	
	H2	EILPGT <u>G</u> TIN <u>Y</u> NEKFKG	8	
	H3	<u>V</u> YYDYD <u>Y</u> GFD <u>Y</u>	9	
	L1	KASQDIDRYLS	1	
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>V</u> QYDEF <u>P</u> Y <u>T</u>	17	
	H1	GYTFSRYWIE	4	
	H2	EILPG <u>S</u> G <u>D</u> IN <u>Y</u> NEKFKG	21	
U23	H3	<u>V</u> YYDYD <u>Y</u> GFD <u>Y</u>	9	2
	L1	KASQDIDRYLS	1	
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>V</u> QYDEF <u>P</u> Y <u>T</u>	17	
	H1	GYTFSRYWIE	4	
	H2	EILPG <u>S</u> G <u>D</u> IN <u>Y</u> NEKFKG	21	
	H3	<u>V</u> YYDYD <u>Y</u> GFD <u>Y</u>	9	
	L1	KASQDIDRYLS	1	
	L2	RVKRLVD	2	
U24	L3	<u>I</u> QYDEF <u>P</u> Y <u>T</u>	15	10
	H1	GYTFSRYWIE	4	
	H2	EILPGT <u>G</u> DIN <u>Y</u> NEKFKG	18	
	H3	<u>V</u> YYDYD <u>Y</u> GFD <u>N</u>	14	
	L1	KASQDIDRYLS	1	
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>V</u> QYDEF <u>P</u> Y <u>T</u>	17	
	H1	GYTFSRYWIE	4	
	H2	EILPG <u>S</u> G <u>D</u> IN <u>Y</u> NEKFKG	21	
U25	H3	<u>V</u> YYDYD <u>Y</u> GFD <u>N</u>	14	0,5
	L1	KASQDIRYLS	1	
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>I</u> QYDEF <u>N</u> Y <u>T</u>	13	
	H1	GYTFSRYWIE	4	
	H2	EILPG <u>S</u> G <u>D</u> IN <u>Y</u> NEKFKG	21	
	H3	<u>V</u> YYDYD <u>Y</u> GFD <u>N</u>	14	
	L1	KASQDIRYLS	1	
	L2	RVKRLVD	2	
U26	L3	<u>I</u> QYDEF <u>P</u> Y <u>T</u>	15	2
	H1	GYTFSRYWIE	4	
	H2	EILPG <u>S</u> G <u>N</u> IN <u>Y</u> NEKFKG	23	
	H3	<u>V</u> YYDYD <u>Y</u> GFD <u>Y</u>	9	
	L1	KFSQDIDRYL <u>T</u>	22	
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>I</u> QYDEF <u>P</u> Y <u>T</u>	15	
	H1	GYTF <u>D</u> RYWIE	10	
	H2	EILPG <u>S</u> G <u>D</u> IN <u>Y</u> NEKFKG	21	
U27	H3	<u>V</u> YYDYD <u>Y</u> GFD <u>Y</u>	9	2
	L1	KFSQDIDRYL <u>T</u>	22	
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>I</u> QYDEF <u>P</u> Y <u>T</u>	15	
	H1	GYTF <u>D</u> RYWIE	10	
	H2	EILPG <u>S</u> G <u>D</u> IN <u>Y</u> NEKFKG	21	
	H3	<u>V</u> YYDYD <u>Y</u> GFD <u>Y</u>	9	
	L1	KASQDIRYLS	1	
	L2	RVKRLVD	2	

ES 2 567 198 T3

(continuación)				
Clon	CDR	Secuencia	SEQ ID NO.	Cl ₅₀ ts/Fab
U28	H2	EILPGSGDININEKFKG	21	2
	H3	VYYDYDYGFDY	9	
	L1	KASQDIDRYLT	12	
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	VQYDEFPYT	17	
U29	H1	GYTFDRYWIE	10	1
	H2	EILPGSGDININEKFKG	21	
	H3	VYYDYDQGFDN	24	
	L1	KASQDIDRYLT	12	
	L2	RVKRLVD	2	
U30	L3	VQYDEFNYT	7	5
	H1	GYTFSRYWIE	4	
	H2	EILPGSGDININEKFKG	21	
	H3	VYYDYDYGFDN	14	
	L1	KASQDIRYLS	1	
U31	L2	RVKRLVD	2	1
	L3	VQYDEFPYT	17	
	H1	GYTFDRYWIE	10	
	H2	EILPGSGDININEKFKG	21	
	H3	VYYDYDYGFDN	14	
U32	L1	KFSQDIDRYLT	22	1
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	VQYDEFPYT	17	
	H1	GYTFSRYWIE	9	
	H2	EILPGSGDININEKFKG	21	
U33	H3	VYYDYDYGFDN	14	1
	L1	KFSQDIRYLT	22	
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	IQYDEFPYT	15	
	H1	GYTFDRYWIE	10	
U34	H2	EILPGSGDININEKFKG	21	0,2
	H3	VYYDYDYGFDN	14	
	L1	KFSQDIDRYLT	22	
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	VQYDEFPYL	25	
U35	H1	GYTFDRYWIE	10	1
	H2	EILPGSGNININEKFKG	23	
	H3	VYYDYDYGFDN	14	
	L1	KFSQDIDRYLT	22	
	L2	RVKRLVD	2	
U35	L3	VQYDEFPYL	25	1
	H1	GYTFDRYWIE	10	
	H2	EILPGTGTININEKFKG	8	
	H3	VYYDYDYGFTN	27	

ES 2 567 198 T3

(continuación)				
Clon	CDR	Secuencia	SEQ ID NO.	Cl ₅₀ ts/Fab
U36	L1	KASQDIDRYLT	12	5
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	VQYDEFPYT	17	
	H1	GYTFDRYWIE	10	
	H2	EILPGSGDININEKFKG	21	
	H3	VYYDYDYGFTY	26	
U37	L1	KFSQDIDRYLT	22	2
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	VQYDEFPYT	17	
	H1	GYTFSRYWIE	4	
	H2	EILPGSGDININEKFKG	21	
	H3	VYYDYDYGFDY	9	
U38	L1	KASQDIDRYLT	12	1
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	VQYDEFNYT	7	
	H1	GYTFSRYWIE	4	
	H2	EILPGTGDININEKFKG	18	
	H3	VYYDYDYGFDN	14	
U39	L1	KFSQDIDRYLT	22	2
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	IQYDEFPYT	15	
	H1	GYTFSRYWIE	4	
	H2	EILPGTGDININEKFKG	18	
	H3	VYYDYDYGFDN	14	
U40	L1	KFSQDIDRYLT	22	1
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	IQYDEFPYL	20	
	H1	GYTFSRYWIE	4	
	H2	EILPGTGDININEKFKG	18	
	H3	VYYDYDYGFDL	11	
U41	L1	KFSQDIDRYLT	22	1
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	VQYDEFPYT	17	
	H1	GYTFSRYWIE	4	
	H2	EILPGTGNININEKFKG	28	
	H3	VYYDYDYGFTL	19	
U43	L1	KASQDIDRFLS	29	10
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	VQYDEFPYT	17	
	H1	GYTFDRYWIE	10	
	H2	EILPGSGDININEKFKG	21	
	H3	MYYDYDQGFSL	30	
U44	L1	KASQDIDRFLT	31	5
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	IQYDEFPYT	15	
	H1	GYTFDRYWIE	10	
	H2	EILPGSGTININEKFKG	16	
	H3	MYYDYDQGFTN	32	
V3	L1	KASQDIDRFLS	33	5
	L2	RVKRLVD	2	

ES 2 567 198 T3

(continuación)

Clon	CDR	Secuencia	SEQ ID NO.	Cl ₅₀ ts/Fab
	L3	<u>V</u> QYDEFPPY <u>T</u>	17	
	H1	GYTF <u>D</u> RYWIE	10	
	H2	EILPG <u>S</u> <u>G</u> DINYN <u>E</u> KFKG	21	
	H3	<u>M</u> YYDYDQGF <u>S</u> <u>L</u>	30	
V4	L1	KASQDIDR <u>F</u> <u>L</u> <u>T</u>	31	10
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>V</u> QYDEF <u>A</u> YT	34	
	H1	GYTF <u>D</u> RYWIE	10	
	H2	EILPG <u>S</u> <u>G</u> DINYN <u>E</u> KFKG	21	
	H3	<u>M</u> YYDYDQGF <u>D</u> <u>Y</u>	35	
V5	L1	KASQDIDR <u>F</u> <u>L</u> <u>T</u>	31	5
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	LQYDEFPPY <u>T</u>	3	
	H1	GYTF <u>D</u> RYWIE	10	
	H2	EILPG <u>T</u> <u>G</u> TINYN <u>E</u> KFKG	8	
	H3	<u>M</u> YYDYDQGF <u>D</u> <u>N</u>	36	
V6	L1	KASQDIDR <u>Y</u> <u>L</u> <u>T</u>	12	3
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>V</u> QYDEFPPY <u>T</u>	17	
	H1	GYTF <u>D</u> RYWIE	10	
	H2	EILPG <u>T</u> <u>G</u> TINYN <u>E</u> KFKG	8	
	H3	<u>V</u> YYDYDY <u>G</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>N</u>	14	
V7	L1	KASQDIDR <u>Y</u> <u>L</u> <u>T</u>	12	2
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	VQYDEFPPY <u>T</u>	17	
	H1	GYTF <u>S</u> RYWIE	4	
	H2	EILPG <u>T</u> <u>G</u> DINYN <u>E</u> KFKG	18	
	H3	<u>V</u> YYDYDY <u>G</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>N</u>	14	
V8	L1	KASQDIDR <u>Y</u> <u>L</u> <u>T</u>	12	3
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>I</u> QYDEFPPY <u>T</u>	15	
	H1	GYTF <u>D</u> RYWIE	10	
	H2	EILPG <u>T</u> <u>G</u> TINYN <u>E</u> KFKG	8	
	H3	<u>V</u> YYDYDY <u>G</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>Y</u>	9	
W1	L1	KASQDIDR <u>Y</u> <u>L</u> <u>T</u>	12	2
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>V</u> QYDEF <u>N</u> Y <u>T</u>	7	
	H1	GYTF <u>S</u> RYWIE	4	
	H2	EILPG <u>S</u> <u>G</u> DINYN <u>E</u> KFKG	21	
	H3	<u>V</u> YYDYDY <u>G</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>N</u>	14	
W2	L1	KFSQDIDR <u>Y</u> <u>L</u> <u>T</u>	22	4
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>V</u> QYDEFPPY <u>T</u>	17	
	H1	GYTF <u>D</u> RYWIE	10	
	H2	EILPG <u>T</u> <u>G</u> DINYN <u>E</u> KFKG	18	
	H3	<u>V</u> YYDYDY <u>G</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>N</u>	14	
W3	L1	KASQDIDR <u>F</u> <u>L</u> <u>T</u>	31	10
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	LQYDEFPPY <u>T</u>	3	
	H1	GYTF <u>D</u> RYWIE	10	

ES 2 567 198 T3

(continuación)				
Clon	CDR	Secuencia	SEQ ID NO.	Cl ₅₀ ts/Fab
W4	H2	EILPG <u>S</u> G <u>D</u> ININEKFKG	21	10
	H3	<u>M</u> YYDYDQGF <u>D</u> Y	35	
	L1	KASQDIDR <u>F</u> L <u>T</u>	31	
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	LQYDEFPYT	3	
	H1	GYTF <u>D</u> RYWIE	10	
W5	H2	EILPG <u>T</u> G <u>T</u> ININEKFKG	8	10
	H3	<u>M</u> YYDYDQGF <u>D</u> Y	35	
	L1	K <u>F</u> SQDIDR <u>F</u> L <u>T</u>	37	
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>V</u> QYDEFPYT	17	
	H1	GYTFSRYWIE	4	
W6	H2	EILPG <u>S</u> G <u>D</u> ININEKFKG	21	5
	H3	<u>M</u> YYDYDQGF <u>S</u> L	30	
	L1	K <u>F</u> SQDIDR <u>F</u> L <u>T</u>	37	
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>V</u> QYDEFPYT	17	
	H1	GYTF <u>D</u> RYWIE	10	
W8	H2	EILPG <u>T</u> G <u>T</u> ININEKFKG	8	5
	H3	<u>M</u> YYDYDQGF <u>T</u> N	32	
	L1	KASQDIDR <u>F</u> L <u>T</u>	31	
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	IQYDEFPYT	15	
	H1	GYTFSRYWIE	4	
W9	H2	EILPG <u>S</u> G <u>T</u> TNINEKFKG	16	5
	H3	<u>M</u> YYDYDQGF <u>D</u> Y	35	
	L1	KASQDIDR <u>F</u> L <u>T</u>	31	
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>V</u> QYDEFPYT	17	
	H1	GYTFSRYWIE	4	
W12	H2	EILPG <u>S</u> G <u>D</u> ININEKFKG	21	10
	H3	<u>M</u> YYDYDQGF <u>D</u> L	38	
	L1	K <u>F</u> SQDIDR <u>F</u> L <u>S</u>	39	
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>V</u> QYDEFPYT	17	
	H1	GYTF <u>D</u> RYWIE	10	
W13	H2	EILPG <u>S</u> G <u>N</u> ININEKFKG	23	15
	H3	<u>M</u> YYDYDQGF <u>T</u> L	40	
	L1	K <u>F</u> SQDBDR <u>F</u> L <u>T</u>	37	
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	IQYDEFPYT	15	
	H1	GYTF <u>D</u> RYWIE	10	
W14	H2	EILPG <u>S</u> G <u>D</u> ININEKFKG	21	10
	H3	<u>M</u> YYDYDQGF <u>D</u> Y	35	
	L1	K <u>F</u> SQDIDR <u>F</u> L <u>S</u>	39	
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>V</u> QYDEFPY <u>G</u>	41	
	H1	GYTFSRYWIE	4	
	H2	EILPG <u>T</u> G <u>D</u> ININEKFKG	18	
	H3	<u>M</u> YYDYDQGF <u>D</u> N	36	

(continuación)

Clon	CDR	Secuencia	SEQ ID NO.	Cl ₅₀ ts/Fab
W17	L1	<u>KFSQDIDRFLS</u>	39	20
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>VQYDEFPYG</u>	41	
	H1	GYTFDRYWIE	10	
	H2	EILPGSGDININEKFKG	21	
	H3	<u>MYDYDQGFDL</u>	38	
W18	L1	<u>KFSQDIDRFLS</u>	39	10
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>VQYDEFPYT</u>	17	
	H1	GYTFDRYWIE	10	
	H2	EILPGSGTININEKFKG	16	
	H3	<u>MYDYDQGFDN</u>	36	
W19	H1	<u>KFSQDIDRFLS</u>	39	10
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>VQYDEFPYT</u>	17	
	H1	GYTFSRYWIE	4	
	H2	EILPGSGNININEKFKG	23	
	H3	<u>MYDYDQGFTY</u>	42	
W20	L1	<u>KFSQDIDRFLS</u>	39	10
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>VQYDEFPYT</u>	17	
	H1	GYTFDRYWIE	10	
	H2	EILPGSGDININEKFKG	21	
	H3	<u>MYDYDQGFDY</u>	35	
W21	L1	<u>KFSQDIDRFLT</u>	37	8
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	<u>IQYDEFPYT</u>	15	
	H1	GYTFDRYWIE	10	
	H2	EILPGSGTININEKFKG	16	
	H3	<u>MYDYDQGFDY</u>	35	
W22	L1	<u>KASQDIDRFLT</u>	31	5
	L2	RVKRLVD	2	
	L3	VQYDEFPYT	17	
	H1	GYTFDRYWIE	10	
	H2	EILPGTGTININEKFKG	8	
	H3	<u>MYDYDQGFDY</u>	35	

En realizaciones específicas, la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado que comprende una K_d de por lo menos 10⁻¹¹ M y muy preferentemente de por lo menos 10⁻¹² M y en el que la k_{off} es de por lo menos de aproximadamente 10⁻³ s⁻¹, preferentemente de por lo menos aproximadamente 5x10⁻⁴ s⁻¹, y muy preferentemente de por lo menos 1x10⁻⁴ s⁻¹ (incluyendo todas las combinaciones de los mismos).

- 5 Los anticuerpos preferentes de la presente invención que se unen a IL-1β humana madura con una K_d de 1x10⁻¹¹ o menos, tienen una constante de velocidad k_{off} de 1x10⁻³ s⁻¹ o menos, neutralizan la actividad de IL-1β humana, y en los cuales se elimina la desamidación en la posición 55 de HCDR2, se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 45-54.

- 10 Se utilizaron estrategias convencionales para caracterizar y sintetizar las bibliotecas de CDR de mutaciones únicas (véase Wu y col, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 95: 6037-6042 (1998)). Primero se eliminó la CDR diana de cada una de las bibliotecas antes de la hibridación de los nucleótidos. Para la síntesis de las bibliotecas, las CDR de un anticuerpo de referencia (véanse las Figuras 1 y 2) se definieron como en la Tabla 1. Para la síntesis del oligonucleótido, se empleó mutagénesis basada en codón para producir las secuencias de CDR de la invención.

- 15 De forma inicial, las bibliotecas se exploraron mediante "elevación de captura" (*capture lift*) para identificar las variantes de mayor afinidad. El procedimiento de "elevación de captura" (Watkins, Methods Mol. Biol. 178: 187-193, (2002)) es conocido en la técnica y es como se describe en el documento WO/0164751 y en el documento US 2002/0098189. Posteriormente, estos clones se caracterizaron adicionalmente utilizando ELISA de captura y

mediante titulación sobre antígeno inmovilizado. Después de tal exploración, se exploran los respectivos valores de k_{off} de los anticuerpos, de los que después se mide su efecto positivo mediante la determinación de la potencia.

Los anticuerpos desvelados en el presente documento contienen CDR que difieren de las de Mu007 en las regiones determinantes de complementariedad L1 (o LCDR1), L3 (o LCDR3), H1 (o HCDR1), H2 (HCDR2) y H3 (o HCDR3).

5 Las CDR de los fragmentos Fab seleccionados se muestran en la Tabla 2 (todos los cuales tienen las secuencias armazón de las Figuras 3 y 4), en donde el clon de referencia es el clon con secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera mostradas en las Figuras 1 y 2 (SEQ ID NO: 43 y 44 para las secuencias de las cadenas ligera y pesada, respectivamente).

10 De acuerdo con la invención, mediante la combinación de tales sustituciones de aminoácidos de modo que se produzca en la misma molécula más de una, fue posible aumentar enormemente la potencia de los anticuerpos desvelados en el presente documento.

En general, hay una correlación entre la k_{off} baja y la potencia del anticuerpo, con todas las variantes de k_{off} más bajas teniendo más de un CDR beneficioso, incluso teniendo hasta cinco CDR sustituidos.

15 Las combinaciones de las secuencias de CDR desveladas en la Tabla 2 pueden estar presentes en moléculas de anticuerpo tetraméricas completas o en fragmentos activos, tales como el fragmento Fab. Los datos de potencia para los clones mostrados en la Tabla 2 son para los fragmentos Fab, aunque los datos para los clones mostrados en la Tabla 4 son para las moléculas de anticuerpo completas en comparación con el anticuerpo de referencia, Mu007.

20 Los anticuerpos de la invención pueden estar presentes en una forma relativamente pura o aislada así como en un sobrenadante extraído de células cultivadas en pocillo o en placas. Los anticuerpos de la invención pueden así estar presentes también en la forma de una composición que comprende al anticuerpo de la invención y en la que dicho anticuerpo se suspende en un diluyente o excipiente farmacológicamente aceptable. Los anticuerpos de la invención pueden estar presentes en tal composición a una concentración, o en una cantidad, suficiente para ser de valor terapéutico o farmacológico en el tratamiento o la prevención de enfermedades (por ejemplo, en la prevención de la artritis reumatoide y la osteoartritis). Los anticuerpos también pueden estar presentes en una composición en una forma más diluida.

25 El ADN que codifica los anticuerpos de la presente invención normalmente incluirá adicionalmente una secuencia de polinucleótido de control de la expresión unida operativamente a las secuencias que codifican los anticuerpos, incluyendo regiones promotoras asociadas de forma natural o heterólogas. Preferentemente, las secuencias de control de la expresión serán sistemas de promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células hospedadoras eucariotas, pero las secuencias de control para los hospedadores procariontes también pueden utilizarse. Una vez que el vector se ha incorporado en la línea celular hospedadora apropiada, la célula hospedadora se propaga en condiciones adecuadas para la expresión de las secuencias de nucleótido, y, si se desea, para la recolección y purificación de las cadenas ligeras, cadenas pesadas, dímeros de cadena ligera/pesada, o anticuerpos intactos, fragmentos de unión u otras formas de inmunoglobulina.

30 Las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención capaces de expresar en última instancia los anticuerpos deseados pueden estar formados de una diversidad de polinucleótidos distintos (genómico o ADNc, ARN, oligonucleótidos sintéticos, etc.) y de componentes (por ejemplo, regiones V, J, D, y C), utilizando cualquiera de una diversidad de técnicas bien conocidas. La unión de secuencias genómicas y sintéticas apropiadas es un procedimiento común de producción, pero también se pueden utilizar secuencias de ADNc.

35 Las secuencias de ADN de la región constante de ser humano se pueden aislar de acuerdo con procedimientos bien conocidos a partir de una diversidad de células de ser humano, pero preferentemente a partir de linfocitos B inmortalizados. Las células fuente adecuadas para las secuencias de polinucleótidos y las células hospedadoras para la expresión y secreción de inmunoglobulinas se pueden obtener a partir de varias fuentes bien conocidas en la técnica.

40 Como se describe en el presente documento, además de los anticuerpos descritos de forma específica en el presente documento, se pueden diseñar y fabricar fácilmente otros anticuerpos modificados "esencialmente homólogos" utilizando diversas técnicas del ADN recombinante bien conocidas para los expertos en la materia. Por ejemplo, las regiones marco conservadas pueden variar desde las secuencias naturales en el nivel de estructura primaria mediante varias sustituciones, adiciones y deleciones terminales e intermedias de aminoácidos, y similares. Además, una diversidad de regiones marco conservadas de ser humano distintas se pueden utilizar individualmente o en combinación como base para las inmunoglobulinas humanizadas de la presente invención. En general, las modificaciones de los genes se pueden llevar a cabo fácilmente mediante una diversidad de técnicas bien conocidas, tales como mutagénesis dirigida.

45 Como alternativa, se pueden producir fragmentos de polipéptido que comprendan solamente una porción de la estructura principal del anticuerpo, cuyos fragmentos posean una o más actividades de inmunoglobulina (por ejemplo, actividad de fijación del complemento). Estos fragmentos de polipéptido pueden producirse mediante

escisión proteolítica de anticuerpos intactos mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, o insertando codones de terminación en los emplazamientos deseados en vectores, utilizando mutagénesis dirigida, tal como después de CH1 para producir fragmentos Fab o después de la región bisagra para producir fragmentos F(ab')₂. Los anticuerpos monocatenarios se pueden producir mediante la unión de VL y VH con un conector de ADN.

5 Como se ha establecido anteriormente, los polinucleótidos se expresarán en hospedadores después de que las secuencias se hayan unido operativamente a (es decir, posicionado para asegurar el funcionamiento de) una secuencia de control de la expresión. Estos vectores de expresión son normalmente replicables en los organismos hospedadores, ya sea como episomas o como parte integral del ADN cromosómico del hospedador. Normalmente, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección, por ejemplo, tetraciclina, neomicina, y dihidrofolato reductasa, para permitir la detección de las células transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

10 *E. coli* es un hospedador procarionta útil en particular para el clonaje de los polinucleótidos de la presente invención. Otros hospedadores microbianos adecuados para su uso incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacterias, tales como *Salmonella*, *Serratia*, y diversas especies de *Pseudomonas*. En estos hospedadores procariontas, también se pueden fabricar vectores de expresión, que normalmente contendrán secuencias de control de la expresión compatibles con la célula hospedadora (por ejemplo, un origen de replicación). Además, puede estar presente cualquiera de los varios promotores bien conocidos, tales como el sistema de promotor lactosa, un sistema de promotor de triptófano (trp), un sistema de promotor de beta lactamasa, o un sistema de promotor del fago lambda. Los promotores normalmente controlarán la expresión, de forma opcional con una secuencia operadora, y tienen secuencias de sitios de unión a ribosoma y similares, para iniciar y acabar la transcripción y la traducción.

20 También se pueden utilizar para la expresión otros microbios, tales como levadura. *Saccharomyces* es un hospedador preferente, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de la expresión, tales como promotores, incluyendo 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, y un origen de la replicación, secuencias de terminación y similares, según se desee.

25 Además de los microorganismos, para la expresión también se pueden utilizar células vegetales. Los procedimientos óptimos para la transformación de plantas variarán según el tipo de planta. Por ejemplo, véase el documento WO00/53794.

30 Para expresar y producir los polipéptidos de la presente invención también se puede utilizar el cultivo celular de tejidos de mamífero. De hecho son preferentes las células eucarióticas, debido a que se han desarrollado en la técnica varias líneas celulares hospedadoras adecuadas capaces de secretar inmunoglobulinas intactas, e incluyen las líneas celulares CHO, diversas líneas celulares COS, líneas celulares de Ovario de Hámster Sirio, células HeLa, líneas celulares de mieloma, linfocitos B transformados, líneas celulares de riñón embrionario de ser humano, o hibridomas. Las líneas celulares preferentes son líneas celulares CHO y de mieloma, tales como SP2/0 y NS0.

35 Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador, y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión a ribosoma, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras transcripcionales. Las secuencias de control de la expresión preferentes son promotores obtenidos de genes de inmunoglobulina, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, citomegalovirus y similares. Los sitios de poliadenilación preferentes incluyen secuencias obtenidas de SV40 y hormona de crecimiento bovina.

40 Los vectores que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés (por ejemplo, las secuencias que codifican las cadenas pesada y ligera, y las secuencias de control de expresión) se pueden transferir en la célula hospedadora mediante procedimientos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de hospedador celular. Por ejemplo, para células procariontas se utiliza normalmente la transfección con cloruro de calcio, mientras que para otros hospedadores celulares se puede utilizar el tratamiento con fosfato de calcio o la electroporación.

45 Una vez expresados, los anticuerpos se pueden purificar de acuerdo con procedimientos convencionales, que incluyen precipitación con sulfato de amonio, intercambio iónico, afinidad (por ejemplo, Proteína A), fase inversa, cromatografía en columna de interacción hidrófoba, electroforesis en gel, y similares. Son preferentes las inmunoglobulinas esencialmente puras que tengan por lo menos aproximadamente el 90 al 95 % de pureza, y muy preferente el 98 al 99 % o más de pureza, para usos farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o hasta homogeneidad según se desee, los polipéptidos pueden después utilizarse de forma terapéutica o profiláctica, como se indica en el presente documento.

55 La presente invención también se refiere a un procedimiento para el tratamiento de seres humanos que experimentan un trastorno inflamatorio mediado por IL-1 β que comprende la administración de una dosis eficaz de un anticuerpo de IL-1 β a un paciente que lo necesite. Los anticuerpos de la presente invención se unen a y evitan la unión de IL-1 β a un receptor de IL-1 β y el inicio de una señal. Los diversos trastornos mediados por IL-1 β incluyen artritis reumatoide (AR), osteoartritis (OA), alergia, choque septicémico o endotóxico, septicemia, asma, enfermedad del injerto frente al hospedador, enfermedad de Crohn y otras enfermedades inflamatorias de los vasos. Además, IL-1 β media las respuestas de defensa del hospedador frente a enfermedades y lesión, locales y sistémicas, y frente a neuroinflamación y la muerte celular en afecciones neurodegenerativas, tales como ictus y traumatismo craneal

isquémico, excitotóxico y traumático. También se ha implicado a IL-1 β en enfermedades degenerativas crónicas, en particular, esclerosis múltiple, enfermedades de Parkinson y de Alzheimer. Preferentemente, los anticuerpos de IL-1 β abarcados en la presente invención se utilizan para tratar AR y/o OA.

5 Los pacientes con AR padecen hinchazón e inflamación crónica de las articulaciones y destrucción continua de cartílago y hueso. IL-1 β y TNF- α son las citocinas más críticas, en la patogenia de la AR. Sin embargo, aunque tanto IL-1 β como TNF- α median la inflamación, IL-1 β es el mediador principal de la destrucción de hueso y cartílago. Los monocitos y fibroblastos activados en el tejido sinovial producen IL-1 β que a su vez estimula la producción de citocinas, prostaglandinas, y metaloproteasas de matriz proinflamatorias adicionales. La unión sinovial se hipertrofia, invadiendo y erosionando el hueso y el cartílago.

10 Los fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (FARME) tales como hidroxiclороquina, oro oral o inyectable, metotrexato, azatioprina, penicilamina, y sulfasalazina, se han utilizado con éxito modesto en el tratamiento de la AR. Su actividad en la modificación del transcurso de la AR se cree que se debe a la eliminación o modificación de mediadores inflamatorios tales como IL-1 β . El metotrexato, por ejemplo, a dosis de 7,5 a 10 mg por semana provocó una reducción en las concentraciones plasmáticas de IL-1 β en pacientes de AR. Se han visto
15 resultados similares con corticoesteroides. Por lo tanto, los anticuerpos de IL-1 β de la presente invención se pueden utilizar solos o en combinaciones con FARME, que pueden actuar para reducir los niveles de proteína IL-1 β en plasma.

Una cantidad eficaz de los anticuerpos de IL-1 β de la presente invención es la cantidad que proporciona eficacia clínica sin efectos secundarios o toxicidad intolerables. La eficacia clínica para los pacientes de AR se puede evaluar
20 utilizando la Definición de Mejora de la American College of Rheumatology (ACR20). Un paciente se considera respondedor si el paciente muestra una mejora del 20 % en el recuento de articulaciones doloridas, el recuento de articulaciones hinchadas, y 3 de 5 de otros componentes que incluyen valoración del dolor del paciente, valoración global del paciente, valoración global del médico, el Cuestionario de Valoración de la Salud, y la proteína C reactiva sérica. Se puede evaluar la prevención del daño estructural mediante la modificación de van der Heijde del sistema
25 de puntuación Sharp para radiografías (recuento de erosión, estrechamiento del espacio articular).

Los anticuerpos de IL-1 β de la presente invención también se pueden utilizar para tratar pacientes que padecen osteoartritis (OA). La OA es la enfermedad más común de las articulaciones en el ser humano y se caracteriza por la pérdida de cartílago articular y la formación de osteofitos. El cuadro clínico incluye dolor, agarrotamiento, y agrandamiento de las articulaciones, inestabilidad, limitación del movimiento, e incapacidad funcional. La OA se ha
30 clasificado en formas idiopática (principal) y secundaria. La American College of Rheumatology ha desarrollado los criterios para la clasificación de la OA de la rodilla y la cadera a base de parámetros clínicos, radiográficos, y de laboratorio.

Una cantidad eficaz de los anticuerpos de IL-1 β de la presente invención es la cantidad que muestra eficacia clínica en pacientes de OA según se midió mediante la mejora del dolor y de las funciones, así como la prevención de daño
35 estructural. Las mejoras del dolor y de las funciones se pueden evaluar utilizando las subescalas de dolor y de función física del Índice de OA de WOMAC. El índice sonda los síntomas relevantes para el paciente clínicamente importantes en las áreas de dolor, agarrotamiento, y función física. La prevención del daño estructural se puede evaluar midiendo el ancho del espacio articular en radiografías de la rodilla y la cadera.

Debido a que los niveles elevados de IL-1 β se han implicado en afecciones neurodegenerativas de ser humano tales como ictus y lesión cerebral (Rothwell, N. J., y col., TINS 23 (12): 618-625, 2000), los anticuerpos anti IL-1 β abarcados en la presente invención también se pueden utilizar para tratar la neuroinflamación asociada con ictus y
40 traumatismo craneal isquémico, excitotóxico y traumático.

Los anticuerpos de la presente invención se administran utilizando técnicas de administración convencionales, preferentemente por vía periférica (es decir, no mediante la administración en el sistema nervioso central), por
45 administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual o por vía de supositorios.

Las composiciones farmacéuticas para la administración se diseñan para ser apropiadas para el modo seleccionado de administración, y los excipientes farmacéuticamente aceptables tales como tampones, tensioactivos, conservantes, agentes solubilizantes y similares se utilizan como sea adecuado. El Remington's Pharmaceutical
50 Sciences, Mack Publishing Co., Easton PA, última edición, proporciona un compendio de las técnicas de formulación como las conocen los médicos en general.

Las concentraciones del anticuerpo de IL-1 β en las formulaciones pueden estar desde tan bajo como aproximadamente el 0,1 % hasta tanto como el 15 o 20 % en peso y se seleccionarán principalmente a base de los volúmenes del líquido, viscosidades, estabilidad, etcétera, de acuerdo con el modo particular de administración
55 seleccionado. Las concentraciones preferentes del anticuerpo de IL-1 β en general estarán en el intervalo de 1 a aproximadamente 100 mg/ml. Preferentemente, de 10 a aproximadamente 50 mg/ml.

La formulación puede incluir un tampón. Preferentemente el tampón es un tampón citrato o un tampón fosfato o una combinación de los mismos. En general, el pH de la formulación está entre aproximadamente 4 y aproximadamente

8. Preferentemente, el pH está entre aproximadamente 5 y aproximadamente 7,5. El pH de la formulación se puede seleccionar para equilibrar la estabilidad del anticuerpo (química y física) y que sea confortable para el paciente cuando se administra. La formulación también puede incluir una sal tal como NaCl. Además, la formulación puede incluir un detergente para evitar la agregación y ayudar a mantener la estabilidad.

5 La formulación puede esterilizarse por filtración después de fabricar la formulación, o hacerse microbiológicamente aceptable de otro modo. Se puede añadir un conservante tal como m-cresol o fenol, o una mezcla de los mismos, para evitar el crecimiento y contaminación microbianos.

10 Una composición típica para infusión intravenosa podría tener un volumen de líquido de tanto como 250 ml, tal como solución de Ringer estéril, y 1-100 mg por ml o más de concentración de anticuerpo. Los agentes terapéuticos de la invención se pueden congelar o liofilizar para el almacenamiento y reconstituir en un vehículo estéril adecuado antes de su uso. La liofilización y reconstitución puede conducir a grados variables de pérdida de actividad del anticuerpo (por ejemplo, con inmunoglobulinas convencionales, los anticuerpos IgM tienden a tener mayor pérdida de actividad que los anticuerpos IgG). Puede tener que ajustarse las dosificaciones para compensar.

15 A pesar de que los procedimientos anteriores parecen ser las más convenientes y los más apropiados para la administración de proteínas tales como anticuerpos humanizados, mediante la adaptación adecuada, se pueden emplear otras técnicas para la administración, tales como administración transdérmica y administración oral siempre que se diseñe la formulación apropiada. Además, puede ser conveniente emplear formulaciones de liberación controlada utilizando películas y matrices biodegradables, o minibombas osmóticas, o sistemas de suministro basados en esferas de dextrano, alginato, o colágeno. En resumen, están disponibles formulaciones para la
20 administración de anticuerpos de la invención, y se pueden elegir a partir de una diversidad de opciones.

Los niveles de dosificación normales se pueden optimizar utilizando técnicas clínicas convencionales y dependerán del modo de administración y del estado del paciente. En general, las dosis estarán en el intervalo de 10 µg/kg/mes hasta 10 mg/kg/mes.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos que no pretenden ser limitantes en modo alguno.

25 **Ejemplo 1**

Afinidad y especificidad de unión

Las afinidades y especificidades de Mu007 y de los anticuerpos de la presente invención se determinaron utilizando las mediciones de BIAcore (Tabla 3). BIAcore™ es un sistema biosensor automatizado que mide interacciones moleculares. (Karlsson, y col. (1991) J. Immunol. Methods 145: 229-240). En estos experimentos el anticuerpo se
30 capturó en una superficie a baja densidad en un chip de BIAcore™. Se utilizó etil-dimetilaminopropil-carbodiimida (EDC) para acoplar los grupos amino reactivos a la Proteína A a una celda de flujo de un chip sensor de BIAcore™ de carboximetilo (CM5). La Proteína A se diluyó en tampón acetato de sodio, pH 4,5, y se inmovilizó en una célula de flujo de un chip de CM5 utilizando EDC para producir 1000 unidades de respuesta. Los sitios que no reaccionaron se bloquearon con etanolamina. Se utilizó un caudal de 60 µl/min. Se realizaron múltiples ciclos de unión/dilución mediante la inyección de 10 µl de solución de 2 - µg/ml de los anticuerpos de la presente invención seguido de IL-1β
35 humana a concentraciones decrecientes para cada ciclo (por ejemplo 1500, 750, 375, 188, 94, 47, 23,5, 12, y 0 picomolar). La elución se realizó con glicina-HCl, pH 1,5. Para analizar los datos de cinética se utilizó BIAevaluation™. El protocolo utilizado para la determinación de la afinidad de Mu007 es como se describe en el documento PCT/US02/21281.

40 Tabla 3. Propiedades de unión de los anticuerpos anti IL-1β a IL-1β humana, determinadas por BIAcore (tampón HBS-EP, pH 7,4 a 25 °C)

CLON	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	Kd (M)
W17 (IgG1)	3,1e7	0,9e-4	2,8e-12
U43 (IgG1)	4,7e7	2,2e-4	4,7e-12
W13 (IgG1)	6,1e7	1,7e-4	2,8e-12
W18 (IgG1)	4,1e7	1,8e-4	4,2e-12
W20 (IgG1)	3,8e7	1,0e-4	2,7e-12
Mu007	2,6e7	1,6e-4	6,2e-12
W17(IgG4)	3,2e7	1,0e-4	3,3e-12

Ejemplo 2

Potencia de anticuerpo

Para determinar la capacidad de los anticuerpos de la presente invención y de Mu007 para neutralizar IL-1 β humana, se utilizó una célula murina que necesita bajos niveles de IL-1 β para la proliferación. Las células T1165.17 que ya no estaban en fase de crecimiento log se lavaron 3 veces con RPMI 1640 (GibcoBRL N.º de Cat 22400-089) complementado con suero fetal bovino al 10 % (GibcoBRL N.º de Cat 10082-147), piruvato de sodio 1 mM, beta mercaptoetanol 50 μ M, y un antibiótico/antimicótico (GibcoBRL N.º de Cat 15240-062). Las células se sembraron en placas a 5.000 células por pocillo de una placa de 96 pocillos. IL-1 β humana estaba presente en un nivel constante de 0,3 pM y se añadió una serie de diluciones del anticuerpo. Las células se incubaron durante 20 horas en un incubador a 37 °C/CO₂ al 5 %, y en ese momento se añadió 1 μ Ci de ³H-timidina por pocillo, y las placas se incubaron en el incubador durante 4 horas adicionales. Las células se recolectaron y se determinó la radiactividad incorporada mediante un contador de centello. La Tabla 4 ilustra la inhibición de la proliferación estimulada por IL-1 β mediante Mu007 y los anticuerpos de la presente invención (isotipos de IgG según se indica).

Tabla 4: CI₅₀ medidas en el ensayo de proliferación de células T1165.17

MUESTRA	CI ₅₀ pM	Veces de aumento de la potencia
Mu007	20,6 \pm 0,5	1
W17(IgG1)	1,8 \pm 0,3	11
U43 (IgG1)	4,0 \pm 0,2	5
W18 (IgG1)	2,0 \pm 0,1	10
W13 (IgG1)	1,2 \pm 0,1	17
W20 (IgG1)	1,2 \pm 0,1	17
W17 (IgG4)	1,7 \pm 0,1	12

Ejemplo 3Neutralización de IL-1 β humana *in vivo*

IL-1 β humana es capaz de unirse y estimular al receptor de IL-1 β de ratón, conduciendo a una elevación de IL-6 de ratón. Se emprendieron experimentos de variación de tiempo y dosis para identificar la dosis óptima de IL-1 β humana y el tiempo óptimo para la inducción de IL-6 de ratón. Estos experimentos indicaron que una dosis de 3 μ g/kg de IL-1 β humana y un tiempo de 2 horas después de la administración de IL-1 β proporcionó niveles máximos de IL-6 en suero de ratón. Los anticuerpos de la presente invención se administraron a 4 ratones a 13, 27, 81, y 270 μ g/kg, una hora antes de una inyección s.c. de IL-1 β humana. A las dos horas después de la administración de IL-1 β , los ratones se sacrificaron, y los niveles de IL-6 se determinaron mediante ELISA. Como controles negativos se utilizaron anticuerpos que emparejaban los isotipos. Los anticuerpos de la presente invención bloquearon los efectos de IL-1 β para estimular el receptor de IL-1 β de ratón, conduciendo a una elevación de la IL-6 de ratón, en una manera dependiente de la dosis (Tabla 5).

TABLAS

Anticuerpo	Niveles séricos de IL-6 pg/ml	DE
IL-1 β Ctl. (3 μ g/kg)	462,0	279,1
Human IgG Ctl (270 μ g/kg)	1,0	1,0
IL-1 β Ctl. (3 μ g/kg) + Human IgG Ctl (270 μ g/kg)	592,3	303,0
W13 Ctl. (270 μ g/kg)	4,1	2,4
W17 Ctl. (270 μ g/kg)	3,2	2,9
W18 Ctl. (270 μ g/kg)	5,2	2,4
U43 Ctl. (270 μ g/kg)	1,3	1,0
IL-1 β (3 μ g/kg) + W13 Ctl. (13 μ g/kg)	655,4	78,0
IL-1 β (3 μ g/kg) + W13 Ctl. (27 μ g/kg)	277,4	97,3
IL-1 β (3 μ g/kg) + W13 Ctl. (81 μ g/kg)	129,2	20,2
IL-1 β (3 μ g/kg) + W13 Ctl. (270 μ g/kg)	23,4	5,3

(continuación)

Anticuerpo	Niveles séricos de IL-6 pg/ml	DE
IL-1 β (3 μ g/kg) + W17 Ctl. (13 μ g/kg)	566,8	294,0
IL-1 β (3 μ g/kg) + W 17 Ctl. (27 μ g/kg)	410,1	107,5
IL-1 β (3 μ g/kg) + W17 Ctl. (81 μ g/kg)	113,7	42,3
IL-1 β (3 μ g/kg) + W17 Ctl. (270 μ g/kg)	27,5	19,6
IL-1 β (3 μ g/kg) + W18 Ctl. (13 μ g/kg)	398,5	143,2
IL-1 β (3 μ g/kg) + W18 Ctl. (27 μ g/kg)	231,8	32,2
IL-1 β (3 μ g/kg) + W18 Ctl. (81 μ g/kg)	77,9	24,7
IL-1 β (3 μ g/kg) + W18 Ctl. (270 μ g/kg)	18,0	5,9
IL-1 β (3 μ g/kg) + U43 Ctl. (13 μ g/kg)	755,7	299,7
IL-1 β (3 μ g/kg) + U43 Ctl. (27 μ g/kg)	509,3	99,6
IL-1 β (3 μ g/kg) + U43 Ctl. (81 μ g/kg)	186,4	80,8
IL-1 β (3 μ g/kg) + U43 Ctl. (270 μ g/kg)	39,3	17,7

Ejemplo 4

5 Expresión de anticuerpo

El siguiente protocolo se aplica a la expresión de cualquiera de los anticuerpos de la presente invención.

Los vectores de expresión que codifican una secuencia líder, y la región constante de la cadena ligera Kappa o la cadena pesada Gamma 1 se utilizaron para clonar las secuencias Fab, lo que dio como resultado genes de anticuerpos completos. Los vectores se pueden utilizar en múltiples líneas celulares de mamífero para la expresión transitoria y estable.

Se cambia la escala de los vectores para generar la cantidad de ADN necesaria para sustentar la transfección. El ADN final permanece como un vector circular cerrado cuando se utiliza en transfecciones transitorias, y se puede linealizar cuando se utiliza en una transfección estable. Para identificar la mejor proporción CL:CH deberían sustentarse transfecciones transitorias a pequeña escala. En cualquier transfección el vector que codifica la cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CH) se mezclan juntos antes de transfectarlos en las células.

Se sustenta la transfección transitoria en células HEK 293 EBNA. La transfección se cambia de escala y se cultiva durante cinco a siete días después de la transfección. El sobrenadante se recolecta y el anticuerpo se purifica utilizando estrategias convencionales para anticuerpos.

Las transfecciones estables en células DG44-CHO (Ovario de Hámster Chino) se pueden sustentar utilizando los vectores descritos. La cantidad de ADN utilizado puede variar desde 20 μ g a 200 μ g. Las células (10^7) se transfectan utilizando una máquina BioRad Gene Pulsar II ajustado a 360 V/950 μ F. Las células se recuperan durante 24-72 horas a 37 °C/CO₂ al 5 %, y después se siembran en placa en selección (medio sin hipoxantina y timidina, y con niveles variable de metotrexato, MTX, para presión adicional).

Las transfecciones estables en células NS0 (mieloma de ratón) se pueden sustentar trasladando los genes de la CL y la CH a vectores de expresión que codifican un gen de la glutamina sintasa. La cantidad de ADN utilizada es de 40 μ g en total. Las células (10^7) se transfectaron utilizando una máquina BioRad Gene Pulsar II ajustada a 300 V/1000 μ F. Las células se recuperan durante 24-72 horas a 37 °C/CO₂ al 10 % y después se siembran en placa en selección (medio sin glutamina y con metionina sulfoximina, MSX, para presión adicional).

Se sustenta una siembra en placa para ambos tipos de líneas celulares a las densidades de siembra específicas para la línea celular (500 c/p de CHO-DG44, 2000 c/p de NS0). Cuando se observa en los pocillos la formación visible de colonias, se puede explorar la producción de anticuerpo en las placas utilizando procedimientos basados en ELISA. Los pocillos que contienen células con una señal positiva para anticuerpo, se expanden en placas de 24 pocillos. Las líneas se cultivan y evalúan en experimentos de expresión para identificar una línea celular candidata con título y calidad de proteína aceptables. El objetivo del esfuerzo en la generación de la línea celular es para identificar un clon al que se le pueda cambiar la escala en condiciones de cultivo sin suero, con título, características de crecimiento y perfil de calidad de producto aceptables.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Applied Molecular Evolution, Inc.

5 <120> Antagonistas de la IL-1 beta humana

<130> X-15950

10 <150> 60/442.798
<151> 24-01-2003

<160> 68

15 <170> PatentIn versión 3.2

<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> Murino

20 <400> 1

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Arg Tyr Leu Ser
1 5 10

25 <210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> Murino

30 <400> 2

Arg Val Lys Arg Leu Val Asp
1 5

35 <210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Murino

40 <400> 3

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr
1 5

45 <210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Murino

<400> 4

50 <210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> Murino

Gly Tyr Thr Phe Ser Arg Tyr Trp Ile Glu
1 5 10

<400> 5

Glu Ile Leu Pro Gly Asn Gly Asn Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1

5

10

15

Gly

5 <210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> Murino

10 <400> 6

Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gln Gly Phe Thr Tyr
1 5 10

15 <210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

20 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 7

Val Gln Tyr Asp Glu Phe Asn Tyr Thr
1 5

25 <210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

30 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 8

35

Glu Ile Leu Pro Gly Thr Gly Thr Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

40 <210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

45 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 9

Val Tyr Tyr Asp Tyr Asp Tyr Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

5 <210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

10 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 10

Gly Tyr Thr Phe Asp Arg Tyr Trp Ile Glu
1 5 10

15 <210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

20 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 11

Val Tyr Tyr Asp Tyr Asp Tyr Gly Phe Asp Leu
1 5 10

25 <210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

30 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 12

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Arg Tyr Leu Thr
1 5 10

40 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

45 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 13

Ile Gln Tyr Asp Glu Phe Asn Tyr Thr
1 5

50 <210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

55

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 14

5

Val Tyr Tyr Asp Tyr Asp Tyr Gly Phe Asp Asn
1 5 10

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

10

<220>
<223> Construcción sintética

15

<400> 15

Ile Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

20

<220>
<223> Construcción sintética

25

<400> 16

Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Thr Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

30

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

35

<220>
<223> Construcción sintética

40

<400> 17

Val Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

45

<220>
<223> Construcción sintética

50

<400> 18

Glu Ile Leu Pro Gly Thr Gly Asp Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

5 <210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 19

Val Tyr Tyr Asp Tyr Asp Tyr Gly Phe Thr Leu
1 5 10

15 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 20

Ile Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Leu
1 5

25 <210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

30 <220>
 <223> Construcción sintética

35 <400> 21

Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Asp Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

40 <210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

45 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 22

Lys Phe Ser Gln Asp Ile Asp Arg Tyr Leu Thr
1 5 10

50

5
<210> 23
<211> 17
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Construcción sintética

10
<400> 23

Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Asn Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

15
<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

20
<220>
<223> Construcción sintética

<400> 24

Val Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gln Gly Phe Asp Asn
1 5 10

25
<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

30
<220>
<223> Construcción sintética

<400> 25

Val Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Leu
1 5

35
<210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
<223> Construcción sintética

45
<400> 26

Val Tyr Tyr Asp Tyr Asp Tyr Gly Phe Thr Tyr
1 5 10

50
<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 27

5 Val Tyr Tyr Asp Tyr Asp Tyr Gly Phe Thr Asn
1 5 10

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

10 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

<223> Construcción sintética

15 <400> 28

Glu Ile Leu Pro Gly Thr Gly Asn Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 29

20 <211> 11

<212> PRT

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

25 <223> Construcción sintética

<400> 29

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Arg Phe Leu Ser
1 5 10

30 <210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

35 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 30

40 <210> 31

Met Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gln Gly Phe Ser Leu
1 5 10

45 <211> 11

<212> PRT

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

50 <223> Construcción sintética

<400> 31

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Arg Phe Leu Thr
1 5 10

ES 2 567 198 T3

<210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL
5
<220>
<223>
10
<400> 32
Met Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gln Gly Phe Thr Asn
1 5 10

<210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL
15
<220>
<223> Construcción sintética
20
<400> 33
Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Arg Phe Leu Ser
1 5 10

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL
25
<220>
<223> Construcción sintética
30
<400> 34
Val Gln Tyr Asp Glu Phe Ala Tyr Thr
1 5

<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL
35
<220>
<223> Construcción sintética
40
<400> 35
Met Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gln Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL
45
<220>
<223> Construcción sintética
50
<400> 36
55
<220>
<223> Construcción sintética
60
<400> 36

Met Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gln Gly Phe Asp Asn
1 5 10

5
 <210> 37
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

10
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 37

Lys Phe Ser Gln Asp Ile Asp Arg Phe Leu Thr
1 5 10

15
 <210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

20
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 38

Met Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gln Gly Phe Asp Leu
1 5 10

25
 <210> 39
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

30
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 39

Lys Phe Ser Gln Asp Ile Asp Arg Phe Leu Ser
1 5 10

40
 <210> 40
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

45
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 40

Met Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gln Gly Phe Thr Leu
1 5 10

50
 <210> 41
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

55
 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 41

5 Val Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Gly
1 5

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

10 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

<223> Construcción sintética

15 <400> 42

Met Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gln Gly Phe Thr Tyr
1 5 10

<210> 43

20 <211> 387

<212> ADN

<213> Murino

25 <400> 43

atggacatga ggaccctgc tcagtttctt ggaatctttt tcttctggtt tccaggtatc 60
agatgtgaca tcaagatgac ccagtcctcca tcttccatgt atgcatctct aggagagaga 120
gtcactatca cttgcaaggc gagtcaggac attgataggt atttaagttg gttccagcag 180
aaaccaggga aatctcctaa gaccctgatc tatcgtgtaa agagattggt agatggggtc 240
ccatcaaggt tcagtgccag cgcactctggg caagattatt ctctcaccat cagcagcctg 300
cagtatgaag atatgggaat ttattattgt ctacagtatg atgagtttcc gtacacgttc 360
ggagggggga ccaagctgga aataaaa 387

<210> 44

30 <211> 417

<212> ADN

<213> Murino

<400> 44

atggaatgga cctgggtctt tctcttctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt cactcccag 60
gttcagctgc agcagctctg agctgagctg atgaagcctg gggcctcagt gaagatatcc 120
tgcaaggcta ctggctacac attcagtagg tattggatag agtggataaa gcagaggcct 180
ggacatggcc ttgagtggat tggagagatt ttacctggaa atggaaatat taactacaat 240
gagaagttca agggcaaggc cacaatctct gcagattctt cctccgaaac agcctacatg 300
caactcagca gcctgtctc tgaggactct gccgtctatt attgttcaac aatctactat 360
gattacgacc aggggtttac ttactggggc caagggactc tggtcactgt ttctgca 417

35

ES 2 567 198 T3

<210> 45
<211> 450
<212> PRT
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL
<220>
<223> Construcción sintética

<400> 45

5

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

10

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Asp Arg Tyr

ES 2 567 198 T3

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

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

- <210> 46
- <211> 214
- <212> PRT
- <213> SECUENCIA ARTIFICIAL
- <220>
- <223> Construcción sintética
- <400> 46

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

<210> 47
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 47

5

10

ES 2 567 198 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Asp Arg Tyr
20 25 30

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

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

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

325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 48
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 48

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

Gly Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 49
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 49

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

5

10

Ala Arg Met Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gln Gly Phe Asp Asn Trp Gly Gln
 100 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

5

<210> 50
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

10

<220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 50

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Phe Ser Gln Asp Ile Asp Arg Phe
 20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

Tyr Arg Val Lys Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu
 210

<210> 51
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 51

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

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

5 <210> 52
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL
 <220>
 <223> Construcción sintética
 10 <400> 52

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

Glu Ser Val Thr **Glu** Gln Asp Ser Lys **Asp** Ser Thr Tyr Ser **Leu** Ser
 165 170 175

Ser Thr **Leu** Thr **Leu** Ser Lys Ala **Asp** Tyr Glu Lys His **Lys** Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys **Glu** Val Thr His Gln **Gly** Leu Ser Ser Pro **Val** Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg **Gly** **Glu**
 210

5 <210> 53
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 53

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

Ser Val Lys **Val** Ser Cys Lys Ala **Ser** Gly Tyr Thr Phe **Asp** Arg Tyr
 20 25 30

Trp Ile **Glu** Trp Val Arg Gln Ala **Pro** Gly Gln Gly **Leu** Glu Trp Met
 35 40 45

Gly **Glu** Ile **Leu** Pro Gly **Ser** Gly Asp Ile Asn **Tyr** Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr **Ile** Thr Ala Asp Lys **Ser** Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu **Leu** Ser **Ser** Leu Arg Ser **Glu** Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Met **Tyr** Tyr Asp Tyr Asp **Gln** Gly Phe Ser **Leu** Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr **Leu** Val Thr Val Ser **Ser** Ala Ser Thr Lys **Gly** Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro **Leu** Ala Pro Ser **Ser** Lys Ser Thr Ser **Gly** Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys **Leu** Val **Lys** Asp Tyr Phe Pro **Glu** Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala **Leu** Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

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

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

5 <210> 54
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL
 10 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 54

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Arg Phe
 20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
 35 40 45

Arg Val Lys Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195

200

205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

5
<210> 55
<211> 407
<212> ADN
<213> HUMANO

<400> 55

```

ggatccactg gtcaggtgca gctggtgca gctggtgca gctggtgca gctggtgca gctggtgca gctggtgca gctggtgca gctggtgca 60
tccgtgaagg tctcctgcaa ggcttctggc tacacattcg accgctattg gatcgagtgg 120
gtgcccagg cccctggcca aggcctggag tggatgggag agattctgcc tggcagcggc 180
gacattaact acaatgagaa gttcaagggc cgcgtcacga ttaccgcgga caaatccacg 240
agcacagcct acatggagct gagcagcctg cgctctgagg acacggccgt gtattactgt 300
gcgcgcatgt actatgatta cgaccagggc tttgactact ggggcccagg caccctggtc 360
accgtctcct ccgctccac caagggccca tcggtcttcc cgctagc 407
    
```

10
15
<210> 56
<211> 407
<212> ADN
<213> HUMANO

<400> 56

```

ggatccactg gtcaggtgca gctggtgca gctggtgca gctggtgca gctggtgca gctggtgca gctggtgca gctggtgca gctggtgca 60
tccgtgaagg tctcctgcaa ggcttctggc tacacattcg accgctattg gatcgagtgg 120
gtgcccagg cccctggcca aggcctggag tggatgggag agattctgcc tggcagcggc 180
gacattaact acaatgagaa gttcaagggc cgcgtcacga ttaccgcgga caaatccacg 240
agcacagcct acatggagct gagcagcctg cgctctgagg acacggccgt gtattactgt 300
gcgcgcatgt actatgatta cgaccagggc tttgacctgt ggggcccagg caccctggtc 360
accgtctcct ccgctccac caagggccca tcggtcttcc cgctagc 407
    
```

20
25
<210> 57
<211> 407
<212> ADN
<213> HUMANO

<400> 57

```

ggatccactg gtcaggtgca gctggtgca gctggtgca gctggtgca gctggtgca gctggtgca gctggtgca gctggtgca gctggtgca 60
tccgtgaagg tctcctgcaa ggcttctggc tacacattcg accgctattg gatcgagtgg 120
gtgcccagg cccctggcca aggcctggag tggatgggag agattctgcc tggcagcggc 180
accattaact acaatgagaa gttcaagggc cgcgtcacga ttaccgcgga caaatccacg 240
agcacagcct acatggagct gagcagcctg cgctctgagg acacggccgt gtattactgt 300
gcgcgcatgt actatgatta cgaccagggc tttgacaact ggggcccagg caccctggtc 360
accgtctcct ccgctccac caagggccca tcggtcttcc cgctagc 407
    
```

ES 2 567 198 T3

<210> 58
 <211> 407
 <212> ADN
 <213> HUMANO

5

<400> 58

ggatccactg gtcaggtgca gctggtgcag tctggcgctg aggtgaagaa gcctggctcc 60
tccgtgaagg tctcctgcaa ggcttctggc tacacattcg accgctattg gatcgagtgg 120
gtgcgccagg cccctggcca aggcctggag tggatgggcg agattctgcc tggcagcggc 180
gacattaact acaatgagaa gttcaagggc cgcgtcacga ttaccgcgga caaatccacg 240
agcacagcct acatggagct gagcagcctg cgctctgagg acacggccgt gtattactgt 300
gcgcgcatgt actatgatta cgaccagggc tttagcctgt ggggccaggg caccctggtc 360
accgtctctt ccgcctccac caagggccca tcggtcttcc cgctagc 407

10

<210> 59
 <211> 407
 <212> ADN
 <213> HUMANO

15

<400> 59

ggatccactg gtcaggtgca gctggtgcag tctggcgctg aggtgaagaa gcctggctcc 60
tccgtgaagg tctcctgcaa ggcttctggc tacacattcg accgctattg gatcgagtgg 120
gtgcgccagg cccctggcca aggcctggag tggatgggcg agattctgcc tggcagcggc 180
gacattaact acaatgagaa gttcaagggc cgcgtcacga ttaccgcgga caaatccacg 240
agcacagcct acatggagct gagcagcctg cgctctgagg acacggccgt gtattactgt 300
gcgcgcatgt actatgatta cgaccagggc tttgactact ggggccaggg caccctggtc 360
accgtctctt ccgcctccac caagggccca tcggtcttcc cgctagc 407

20

<210> 60
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> HUMANO

25

<400> 60

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggcca ccgcgtcacc 60
atcacttcta agttcagtca ggacattgat cgcttctgga cctggtttca gcagaaacca 120
ggcaaagccc ctaagtccct gatctatcgc gtgaagcgcc tggatggatgg cgtcccatcc 180
cgcttcagcg gcagtggctc tggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgcatccag tatgatgagt ttccgtacac cttcggcggc 300
ggcaccaagg tggagatcaa a 321

30

<210> 61
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> HUMANO

<400> 61

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggcca ccgcgtcacc 60
 atcacttgta agttcagtc ggacattgat cgcttcctga gctggtttca gcagaaacca 120
 ggcaaagccc ctaagtccct gatctatcgc gtgaagcgcc tggatgatgg cgtcccatcc 180
 cgcttcagcg gcagtggctc tggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgcttcag tatgatgagt ttccgtacgg ttccggcggc 300
 ggcaccaagg tggagatcaa a 321

5 <210> 62
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> HUMANO

<400> 62

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggcca ccgcgtcacc 60
 atcacttgta agttcagtc ggacattgat cgcttcctga gctggtttca gcagaaacca 120
 ggcaaagccc ctaagtccct gatctatcgc gtgaagcgcc tggatgatgg cgtcccatcc 180
 cgcttcagcg gcagtggctc tggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgcttcag tatgatgagt ttccgtacac cttcggcggc 300
 ggcaccaagg tggagatcaa a 321

10 <210> 63
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> HUMANO

<400> 63

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggcca ccgcgtcacc 60
 atcacttgta agttcagtc ggacattgat cgcttcctga gctggtttca gcagaaacca 120
 ggcaaagccc ctaagtccct gatctatcgc gtgaagcgcc tggatgatgg cgtcccatcc 180
 cgcttcagcg gcagtggctc tggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgcttcag tatgatgagt ttccgtacac cttcggcggc 300
 ggcaccaagg tggagatcaa a 321

20 <210> 64
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> HUMANO

<400> 64

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggcca ccgcgtcacc 60
 atcacttgta aggcgagtc ggacattgat cgcttcctga gctggtttca gcagaaacca 120
 ggcaaagccc ctaagtccct gatctatcgc gtgaagcgcc tggatgatgg cgtcccatcc 180
 cgcttcagcg gcagtggctc tggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgcttcag tatgatgagt ttccgtacac cttcggcggc 300
 ggcaccaagg tggagatcaa a 321

ES 2 567 198 T3

5 <210> 65
 <211> 990
 <212> ADN
 <213> HUMANO

<400> 65

```

tccaccaagg gcccatcggg cttccccgcta gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc      60
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg      120
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga      180
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac      240
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa      300
tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tggccagcac ctgaactcct ggggggaccg      360
tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacaccctca tgatctcccc gaccctgag      420
gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac      480
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc      540
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag      600
tacaagtgca aggtctcaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa      660
gccaaggggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggacgagctg      720
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc      780
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc ccccgctgctg      840
gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag      900
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag      960
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga      990
  
```

10 <210> 66
 <211> 952
 <212> ADN
 <213> HUMANO

15 <400> 66

```

ctagcgcctt gctccaggag cacctccgag agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag      60
gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg      120
cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc      180
gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc tacaccctgca acgtagatca caagcccagc      240
aacaccaagg tggacaagag agttgagtc aaatatggtc ccccatgccc accctgcccc      300
gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact      360
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg tgctggtggtg tggacgtgag ccaggaagac      420
  
```

cccgagggtcc agttcaactg gtacgtggat ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 480
 ccgcggggagg agcagttcaa cagcacgtac cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 540
 caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctccccgtcc 600
 tccatcgaga aaacctctc caaagccaaa gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc 660
 ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa 720
 ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 780
 tacaagacca cgcctcccg tctggactcc gacggctcct tcttctcta cagcaggcta 840
 accgtggaca agagcagggtg gcaggagggg aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag 900
 gctctgcaca accactacac acagaagagc ctctccctgt ctctgggtaa at 952

5 <210> 67
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> HUMANO

<400> 67

cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccccat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
 tggaaggtgg ataacgcctt ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
 agcttcaaca ggggagagtg ctaa 324

10
 <210> 68
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

20 <400> 68

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

ES 2 567 198 T3

Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr
 85 90 95
 Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
 100 105 110
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gln Gly Phe Asp
 115 120 125
 Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
 145 150 155 160
 Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
 210 215 220
 Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
 225 230 235 240
 Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe 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 Gln
 275 280 285
 Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe 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 Gly Leu Pro Ser Ser 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 Gln Glu Glu Met 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
 385 390 400

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 Arg Leu Thr Val
 420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu 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

Leu Gly Lys
 465

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que se une de forma específica a IL-1 β humana, en el que dicho anticuerpo comprende:
- 5 a) una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39;
 b) una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;
 c) una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41;
 d) una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10;
 e) una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21; y,
 f) una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38.
- 10 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que codifica la secuencia de polinucleótido mostrada en la SEQ ID NO: 56 y una región variable de cadena ligera que codifica la secuencia de polinucleótido mostrada en la SEQ ID NO: 61.
- 15 3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende una cadena pesada que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 47 y una cadena ligera que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 48.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende una cadena pesada que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 68 y una cadena ligera que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 48.
- 20 5. El anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho anticuerpo tiene un isotipo IgG.
6. El anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 5, en el que el isotipo se selecciona del grupo que consiste en regiones constantes de cadena pesada de IgG1 e IgG4.
7. El anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 6, en el que el isotipo es IgG1 que codifica el polinucleótido mostrado en la SEQ ID NO: 65.
- 25 8. El anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 6, en el que el isotipo es IgG4 que codifica el polinucleótido mostrado en la SEQ ID NO: 66.
9. El anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho anticuerpo tiene una región constante de cadena kappa de cadena ligera que codifica el polinucleótido mostrado en la SEQ ID NO: 67.
- 30 10. Un ácido nucleico aislado, que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 10.
12. Una célula hospedadora transfectada de forma estable con el vector de expresión de la reivindicación 11, en la que la célula hospedadora expresa una proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 35 13. La célula hospedadora de la reivindicación 12, en la que la célula hospedadora se selecciona del grupo que consiste en una célula de Ovario de Hámster Chino, célula de mieloma SP2/0, célula de mieloma NS0, una célula de ovario de hámster Sirio, y una célula de riñón embrionario.
14. Un procedimiento de producción de un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende el cultivo de la célula hospedadora de la reivindicación 12 o 13 y la recuperación del polipéptido que codifica dicho polinucleótido a partir de cultivo.
- 40 15. Un procedimiento de mejora de la estabilidad de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une de forma específica a IL-1 β humana, en el que dicho procedimiento comprende la eliminación de la desamidación en la posición 6 de la HCDR2 o la posición 55 de la HCVR.
- 45 16. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
17. Un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso como un medicamento.
18. Un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide o de la osteoartritis.