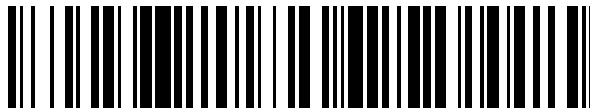


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 594**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 51/10</b>	(2006.01) <b>A61P 25/16</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/24</b>	(2006.01) <b>A61P 19/02</b>	(2006.01)
<b>C07K 17/00</b>	(2006.01) <b>A61P 1/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/395</b>	(2006.01) <b>A61P 17/06</b>	(2006.01)
<b>A61K 49/16</b>	(2006.01) <b>A61P 3/10</b>	(2006.01)
<b>C07H 21/00</b>	(2006.01) <b>A61P 9/10</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/21</b>	(2006.01) <b>A61P 33/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/20</b>	(2006.01)	
<b>A61K 49/04</b>	(2006.01)	
<b>A61P 25/04</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2011 PCT/US2011/036444**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2011 WO11143562**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2011 E 11781350 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2571532**

54 Título: **Proteínas de unión a IL-1**

30 Prioridad:

**14.05.2010 US 334917 P**  
**21.12.2010 US 425701 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.10.2017**

73 Titular/es:

**ABBVIE INC. (100.0%)**  
**1 North Waukegan Road**  
**North Chicago, IL 60064, US**

72 Inventor/es:

**WU, CHENGBIN;**  
**AMBROSI, DOMINIC, J.;**  
**HSIEH, CHUNG-MING y**  
**GHAYUR, TARIQ**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 635 594 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

Proteínas de unión a IL-1

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a proteínas de unión a IL-1 y específicamente a sus usos en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades inmunológicas agudas y crónicas, tales como la artritis reumatoide, la osteoartritis, la psoriasis, la esclerosis múltiple y otras enfermedades autoinmunes.

**Antecedentes de la invención**

10 Las citocinas, tales como la interleucina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF), son moléculas producidas por una variedad de células, tales como monocitos y macrófagos, que son mediadores de procesos inflamatorios. La interleucina-1 es una citocina con una amplia gama de efectos biológicos y fisiológicos, incluyendo fiebre, síntesis de prostaglandinas (por ejemplo, en fibroblastos, células musculares y células endoteliales), activación de linfocitos T y producción de interleucina-2.

15 Los miembros originales de la superfamilia de IL-1 son IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra, IL-1RA, IL-1ra, IL-1R $\alpha$ ). IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  son citocinas proinflamatorias que intervienen en la defensa inmune contra una infección. El IL-1R $\alpha$  es una molécula que compite por la unión al receptor con IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , bloqueando su función en la activación inmune. En los últimos años se ha observado la adición de otras moléculas a la superfamilia de IL-1, incluyendo IL-18 (véase, Dinarello et al., FASEB J., 8(15):1314-3225 (1994); Huisin et al., Dev. Comp. Immunol., 28(5):395-413 (2004)) y seis genes más con homología estructural con IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o IL-1RA. Estos últimos seis miembros se denominan IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, IL1F9 e IL1F10. De conformidad, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-1RA se han renombrado IL-1F1, IL-1F2 e IL-1F3, respectivamente (véase, Sims et al., Trends Immunol., 22(10): 536-537 (2001); Dunn et al., Trends Immunol., 22(10): 533-536 (2001)). Un miembro putativo adicional de la familia de IL-1 se ha descrito, denominado IL-33 o IL-1F11, aunque este nombre no está aceptado oficialmente en la base de datos de la nomenclatura de las familias de genes HGNC.

25 Tanto IL-1 $\alpha$  como IL-1 $\beta$  son producidas por macrófagos, monocitos y células dendríticas. Forman una parte importante de la respuesta inflamatoria del cuerpo contra una infección. Estas citocinas aumentan la expresión de los factores de adhesión en las células endoteliales para permitir la transmigración de leucocitos, las células que combaten los agentes patógenos, a los sitios de infección y reestablecer el centro termorregulador del hipotálamo, lo que conduce a una temperatura corporal incrementada que se autoexpresa como fiebre. Por lo tanto, IL-1 se denomina un pirógeno endógeno. El aumento de la temperatura corporal ayuda al sistema inmunológico corporal a combatir infecciones. La IL-1 también es importante en la regulación de la hematopoyesis. La producción de IL-1 $\beta$  en el tejido periférico también se ha asociado con la hiperalgesia (un aumento de la sensibilidad frente al dolor) asociada con fiebre (Morgan et al., Brain Res., 1022(1-2): 96-100 (2004)). Generalmente, estas dos formas de IL-1 se unen al mismo receptor celular. Este receptor se compone de dos subunidades relacionadas, pero no idénticas que transmiten señales intracelulares a través de una vía que en su mayoría está compartida con ciertos otros receptores. Estos incluyen la familia Toll de receptores inmunes innatos y el receptor de IL-18. IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  también poseen propiedades biológicas similares, incluyendo la inducción de fiebre, el sueño de ondas lentas y la neutrofilia, la activación de linfocitos T y B, la proliferación de fibroblastos, la citotoxicidad frente a ciertas células, la inducción de colagenasas, la síntesis de proteínas de fase aguda hepática y el aumento de la producción de factores estimulantes de colonias y colágeno.

40 Los ADNc que codifican las dos formas distintas de IL-1 se han aislado y expresado; estos ADNc representan dos productos génicos diferentes, denominados IL-1 $\beta$  (Auron et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 7907-7911 (1984)) e IL-1 $\alpha$  (Lomedico et al., Nature, 312: 458-462 (1984)). IL-1 $\beta$  es la forma predominante producida por monocitos humanos tanto a niveles de ARNm como de proteína. Las dos formas de IL-1 humana comparten solo un 26% de homología de aminoácidos. A pesar de sus secuencias de polipéptidos distintas, las dos formas de IL-1 tienen similitudes estructurales (Auron et al., J. Mol. Cell Immunol., 2: 169-177 (1985)), porque la homología de aminoácidos se limita a regiones discretas de la molécula de IL-1.

50 IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  se producen como péptidos precursores. En otras palabras, se preparan como una proteína larga que luego se procesa para liberar una molécula activa más corta, que se llama la proteína madura. La IL-1 $\beta$  madura, por ejemplo, se libera a partir de Pro-IL-1 $\beta$  después de la escisión con un cierto miembro de la familia de proteínas caspasas, llamada caspasa-1 o la enzima convertidora de interleucina-1 (ICE). La estructura tridimensional de las formas maduras de cada miembro de la superfamilia de IL-1 humana se compone de 12-14 hebras  $\beta$  que producen una proteína en forma de barril.

55 Aunque se ha descrito una variedad de anticuerpos para IL-1 en las casi dos décadas de trabajo desde el descubrimiento de esta citocina proinflamatoria decisiva, sigue habiendo una necesidad de mejorar los anticuerpos que pueden mediar o neutralizar con eficacia la actividad de IL-1 en la respuesta inflamatoria y trastornos autoinmunes y para uso en la detección de IL-1 $\beta$  en muestras y tejidos.

Wu et al., Nature Biotechnology, 25(11): 1290-1297 (2007) se refieren a un modelo de una molécula similar a

inmunoglobulina G (IgG) con doble especificidad, tetravalente que se puede diseñar genéticamente a partir de cualquiera de dos anticuerpos monoclonales, a la vez que conserva las actividades de los anticuerpos parentales. Wu et al., MAbs, 1(4): 339-347 (2009) se refieren al desarrollo de moléculas anti-IL-1 $\alpha$ / $\beta$  humana, utilizando diversas parejas de anticuerpos monoclonales. Murtaza, American College of Rheumatology 2007 Annual Scientific Meeting, disponible en <https://acr.confex.com/acr/2007/webprogram/Paper7838.html>, se refiere a una DVD-Ig anti-IL-1 $\alpha$ / $\beta$  que mostraba una eficacia comparable en el modelo de artritis de ratón inducida por colágeno, a la de anticuerpos IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  monoespecíficos en combinación. El documento de EE.UU. 2009/311253 se refiere a proteínas de unión multivalentes y multiespecíficas, modificadas genéticamente, capaces de unirse a IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , a métodos de preparación y específicamente a sus usos en la prevención, el diagnóstico y/o el tratamiento de una enfermedad. El documento de EE.UU. 2009/291081 se refiere a anticuerpos de doble especificidad o a una porción de los mismos, que se unen a antígeno, que son específicos de IL-1 $\alpha$  humana e IL-1 $\beta$  humana. El documento de EE.UU. 2007/071675 y WO 2007/024715 se refieren a proteínas de unión multivalentes y multiespecíficas modificadas genéticamente, a métodos de preparación y específicamente a sus usos en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas y otras enfermedades.

### 15 **Compendio de la invención**

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas y mediante las mismas. Esta invención se refiere a proteínas que se unen a IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  humanas. Las proteínas de unión de la invención incluyen pero no se limitan a anticuerpos, porciones de los mismos que se unen a antígeno y proteínas de unión multivalentes, multiespecíficas tales como proteínas de unión DVD-Ig<sup>®</sup> que se pueden unir a IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  humanas. La invención también proporciona métodos de preparación y de uso de las proteínas que se unen a IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  descritas en el presente documento, así como varias composiciones que se pueden utilizar en métodos de detección de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en una muestra o en métodos de tratamiento o prevención de un trastorno en un individuo, que está asociado o se sospecha que está asociado con la actividad de IL-1.

La descripción proporciona una proteína de unión que comprende una primera y segunda cadenas polipeptídicas, en donde dicha primera cadena polipeptídica comprende un primer VD1-(X1) $n$ -VD2-C-(X2) $n$ , en donde:

VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada;

C es un dominio constante de cadena pesada;

X1 es un enlazador con la condición de que no sea CH1;

30 X2 es una región Fc; y

n es independientemente 0 o 1; y

en donde dicha segunda cadena polipeptídica comprende un segundo VD1-(X1) $n$ -VD2-C-(X2) $n$ , en donde:

VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera;

35 C es un dominio constante de cadena ligera;

X1 es un enlazador con la condición de que no sea CH1;

X2 no comprende una región Fc; y

n es independientemente 0 o 1;

40 en donde, en dicha primera cadena polipeptídica, VD1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 60-148, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208 y 210; y VD2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 213 y 227;

en donde, en dicha segunda cadena polipeptídica, VD1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 149-189, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209 y 211; y VD2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 216 y 229; y

45 en donde la proteína de unión se une a IL-1 $\beta$  humana y a IL-1 $\alpha$  humana.

La proteína de unión descrita anteriormente puede comprender una primera cadena polipeptídica que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 212, 217, 226, 230, 232, 234 y 236.

La proteína de unión descrita anteriormente puede comprender una segunda cadena polipeptídica que comprende

## ES 2 635 594 T3

una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 215, 218, 228, 231, 233, 235 y 237.

La descripción también proporciona una proteína de unión que comprende una primera y segunda cadenas polipeptídicas, en donde dicha primera cadena polipeptídica comprende un primer VD1-(X1)<sup>n</sup>-VD2-C-(X2)<sup>n</sup>, en donde:

VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada;

C es un dominio constante de cadena pesada;

X1 es un enlazador con la condición de que no sea CH1;

X2 es una región Fc; y

n es independientemente 0 o 1; y

en donde dicha segunda cadena polipeptídica comprende un segundo VD1-(X1)<sup>n</sup>-VD2-C-(X2)<sup>n</sup>, en donde:

VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera;

C es un dominio constante de cadena ligera;

X1 es un enlazador con la condición de que no sea CH1;

X2 no comprende una región Fc; y

n es independientemente 0 o 1;

en donde, en dicha primera cadena polipeptídica, VD1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 213 y 227; y VD2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 60-148, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208 y 210;

en donde, en dicha segunda cadena polipeptídica, VD1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 216 y 229; y VD2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 149-189, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209 y 211; y

en donde la proteína de unión se une a IL-1 $\beta$  humana y a IL-1 $\alpha$  humana.

La proteína de unión descrita anteriormente puede comprender una primera cadena polipeptídica que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 219 y 221.

La proteína de unión descrita anteriormente puede comprender una segunda cadena polipeptídica que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 220 y 222.

La descripción también proporciona una proteína de unión descrita anteriormente, en donde:

cuando dicha primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 212, entonces dicha segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 215, 228, 231, 233 y 235;

cuando dicha primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 217, entonces dicha segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 218 y 237;

cuando dicha primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 219, entonces dicha segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 220;

cuando dicha primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 221, entonces dicha segunda cadena polipeptídica comprende SEQ ID NO: 222;

cuando dicha primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 226, entonces dicha segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 228, 215, 231, 233 y 235;

cuando dicha primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 230, entonces dicha segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir

del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 231, 215, 228, 233 y 235;

cuando dicha primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 232, entonces dicha segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 233, 215, 228, 231 y 235;

5 cuando dicha primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 234, entonces dicha segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 235, 215, 228, 231 y 233; y

cuando dicha primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 236, entonces dicha segunda cadena polipeptídica comprende SEQ ID NO: 237.

10 La invención proporciona una proteína descrita anteriormente, en donde:

dicha primera cadena polipeptídica comprende SEQ ID NO: 212 y dicha segunda cadena polipeptídica comprende SEQ ID NO: 215.

La descripción también proporciona una proteína descrita anteriormente, en donde: dicha primera cadena polipeptídica comprende SEQ ID NO: 217 y dicha segunda cadena polipeptídica comprende SEQ ID NO: 218; o

15 dicha primera cadena polipeptídica comprende SEQ ID NO: 219 y dicha segunda cadena polipeptídica comprende SEQ ID NO: 220; o

dicha primera cadena polipeptídica comprende SEQ ID NO: 221 y dicha segunda cadena polipeptídica comprende SEQ ID NO: 222; o

20 dicha primera cadena polipeptídica comprende SEQ ID NO: 226 y dicha segunda cadena polipeptídica comprende SEQ ID NO: 228; o

dicha primera cadena polipeptídica comprende SEQ ID NO: 230 y dicha segunda cadena polipeptídica comprende SEQ ID NO: 231; o

dicha primera cadena polipeptídica comprende SEQ ID NO: 232 y dicha segunda cadena polipeptídica comprende SEQ ID NO: 233; o

25 dicha primera cadena polipeptídica comprende SEQ ID NO: 234 y dicha segunda cadena polipeptídica comprende SEQ ID NO: 235; o

dicha primera cadena polipeptídica comprende SEQ ID NO: 236 y dicha segunda cadena polipeptídica comprende SEQ ID NO: 237.

30 Las proteínas de unión descritas anteriormente pueden comprender dos primeras cadenas polipeptídicas y dos segundas cadenas polipeptídicas.

En la proteína de unión descrita anteriormente, X1 o X2 puede ser una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 26-57, 233, 224 y 225.

35 La descripción también proporciona una proteína de unión descrita anteriormente en donde la región Fc se selecciona a partir del grupo que consiste en una región Fc de secuencia natural y una región Fc de secuencia variante. La región Fc se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en una región Fc procedente de una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE e IgD.

40 La descripción proporciona un conjugado de proteína de unión que comprende una proteína de unión descrita anteriormente y comprende además un agente. Tales agentes incluyen, pero no se limitan a, una molécula de inmunoadhesión, un agente de formación de imagen, un agente terapéutico y un agente citotóxico. Los agentes formadores de imágenes preferidos incluyen, pero no se limitan a, un radiomarcador, una enzima, un marcador fluorescente, un marcador luminiscente, un marcador bioluminiscente, un marcador magnético y biotina. Los radiomarcadores preferidos incluyen, pero no se limitan a, <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>35</sup>S, <sup>90</sup>Y, <sup>99</sup>Tc, <sup>111</sup>In, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>177</sup>Lu, <sup>166</sup>Ho y <sup>153</sup>Sm. Un agente terapéutico o citotóxico preferido incluye, pero no se limita a, un antimetabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citocina, un agente anti-angiogénico, un agente anti-mitótico, una antraciclina, una toxina y un agente apoptótico.

45 La descripción también proporciona una proteína de unión que comprende un dominio que se une a antígeno, en donde la proteína de unión es capaz de unirse a IL-1 $\beta$  humana y el dominio que se une a antígeno comprende seis CDRs, es decir, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, como se definen a continuación:

CDR-H1: X<sub>1</sub>-Y-D-M-S (SEQ ID NO:190), en donde;

50 X<sub>1</sub> es S, K o R;

CDR-H2: Y-X<sub>2</sub>-S-X<sub>4</sub>-G-G-X<sub>7</sub>-G-T-Y-Y-P-D-X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>-K-G (SEQ ID NO:191), en donde;

X<sub>2</sub> es I o V;

X<sub>4</sub> es S o H;

X<sub>7</sub> es G o A;

5 X<sub>14</sub> es T o S; y

X<sub>15</sub> es V o A;

CDR-H3: G-G-V-X<sub>4</sub>-K-G-X<sub>7</sub>-F-D-X<sub>10</sub> (SEQ ID NO:192), en donde;

X<sub>4</sub> es T o Y;

X<sub>7</sub> es Y o C; y

10 X<sub>10</sub> es V, E, L, M, Q, o Y;

CDR-L1: R-A-S-G-N-I-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-L-X<sub>11</sub> (SEQ ID NO:193), en donde;

X<sub>7</sub> es H, Y o W;

X<sub>8</sub> es N, G, T, Q, E, H, D o K;

X<sub>9</sub> es Y o W; y

15 X<sub>11</sub> es T, A o N;

CDR-L2: X<sub>1</sub>-A-K-X<sub>4</sub>-L-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub> (SEQ ID NO:194), en donde;

X<sub>1</sub> es N, Q o D;

X<sub>4</sub> es T, N, I, E o S;

X<sub>6</sub> es A, M o E; y

20 X<sub>7</sub> es D, E, S o A;

y

CDR-L3: Q-X<sub>2</sub>-F-W-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-P-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub> (SEQ ID NO:195), en donde;

X<sub>2</sub> es H o Q;

X<sub>5</sub> es S, N, T, K, R o M;

25 X<sub>6</sub> es I o L;

X<sub>8</sub> es Y o A; y

X<sub>9</sub> es T, I y N;

excepto que cuando CDR-H1 es S-Y-D-M-S (SEQ ID NO:17), entonces:

CDR-H2 no puede ser Y-I-S-S-G-G-G-G-T-Y-Y-P-D-T-V-K-G (SEQ ID NO:18);

30 CDR-H3 no puede ser G-G-V-T-K-G-Y-F-D-V (SEQ ID NO:19);

CDR-L1 no puede ser R-A-S-G-N-I-H-N-Y-L-T (SEQ ID NO:20);

CDR-L2 no puede ser N-A-K-T-L-A-D (SEQ ID NO:21); y

CDR-L3 no puede ser Q-H-F-W-S-I-P-Y-T (SEQ ID NO:22).

35 Una proteína de unión aislada descrita anteriormente puede comprender al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo de secuencias de CDRs que consisten en:

residuos 31-35 de SEQ ID NO:60 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:63 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:60 (CDR-H2);	residuos 50-66 de SEQ ID NO:63 (CDR-H2);

ES 2 635 594 T3

residuos 99-108 de SEQ ID NO:60 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:63 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:149 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:150 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:149 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:150 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:149 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:150 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:69 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:97 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:69 (CDR-H2);	residuos 50-66 de SEQ ID NO:97 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:69 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:97 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:173 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:187 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:173 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:187 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:173 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:187 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:67 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:90 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:67 (CDR-H2)	residuos 50-66 de SEQ ID NO:90 (CDR-H2)
residuos 99-108 de SEQ ID NO:67 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:90 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:151 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:156 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:151 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:156 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:151 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:156 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:88 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:92 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:88 (CDR-H2);	residuos 50-66 de SEQ ID NO:92 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:88 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:92 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:159 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:153 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:159 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:153 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:159 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:153 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:96 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:94 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:96 (CDR-H2);	residuos 50-66 de SEQ ID NO:94 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:96 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:94 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:155 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:166 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:155 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:166 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:155 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:166 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:90 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:82 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:90 (CDR-H2)	residuos 50-66 de SEQ ID NO:82 (CDR-H2)
residuos 99-108 de SEQ ID NO:90 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:82 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:182 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:159 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:182 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:159 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:182 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:159 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:90 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:101 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:90 (CDR-H2);	residuos 50-66 de SEQ ID NO:101 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:90 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:101 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:167 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:158 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:167 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:158 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:167 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:158 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:90 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:96 (CDR-H1);

ES 2 635 594 T3

residuos 50-66 de SEQ ID NO:90 (CDR-H2);	residuos 50-66 de SEQ ID NO:96 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:90 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:96 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:164 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:157 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:164 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:157 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:164 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:157 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:73 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:70 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:73 (CDR-H2);	residuos 50-66 de SEQ ID NO:70 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:73 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:70 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:174 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:161 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:174 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:161 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:174 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:161 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:86 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:83 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:86 (CDR-H2);	residuos 50-66 de SEQ ID NO:83 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:86 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:83 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:159 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:158 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:159 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:158 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:159 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:158 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:90 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:102 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:90 (CDR-H2);	residuos 50-66 de SEQ ID NO:102 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:90 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:102 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:169 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:185 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:169 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:185 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:169 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:185 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:91 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:98 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:91 (CDR-H2);	residuos 50-66 de SEQ ID NO:98 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:91 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:98 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:165 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:160 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:165 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:160 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:165 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:160 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:76 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:74 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:76 (CDR-H2);	residuos 50-66 de SEQ ID NO:74 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:76 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:74 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:175 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:186 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:175 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:186 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:175 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:186 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:99 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:95 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:99 (CDR-H2);	residuos 50-66 de SEQ ID NO:95 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:99 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:95 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:189 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:157 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:189 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:157 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:189 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:157 (CDR-L3);



ES 2 635 594 T3

residuos 31-35 de SEQ ID NO:100 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:72 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:100 (CDR-H2);	residuos 50-66 de SEQ ID NO:72 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:100 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:72 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:168 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:178 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:168 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:178 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:168 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:178 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:71 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:96 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:71 (CDR-H2)	residuos 50-66 de SEQ ID NO:96 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:71 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:96 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:170 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:163 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:170 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:163 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:170 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:163 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:84 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:77 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:84 (CDR-H2);	residuos 50-66 de SEQ ID NO:77 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:84 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:77 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:188 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:183 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:188 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:183 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:188 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:183 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:78 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:90 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:78 (CDR-H2);	residuos 50-66 de SEQ ID NO:90 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:78 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:90 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:179 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:171 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:179 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:171 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:179 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:171 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:93 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:79 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:93 (CDR-H2);	residuos 50-66 de SEQ ID NO:79 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:93 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:79 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:176 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:180 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:176 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:180 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:176 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:180 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:87 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:381 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:87 (CDR-H2)	residuos 50-66 de SEQ ID NO:381 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:87 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:381 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:154 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:152 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:154 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:152 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:154 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:152 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:85 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:81 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:85 (CDR-H2);	residuos 50-66 de SEQ ID NO:81 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:85 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:81 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:162 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:177 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:162 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:177 (CDR-L2);

ES 2 635 594 T3

residuos 89-97 de SEQ ID NO:162 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:177 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:89 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:80 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:89 (CDR-H2);	residuos 50-66 de SEQ ID NO:80 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:89 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:80 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:170 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:172 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:170 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:172 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:170 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:172 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:75 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:196 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:75 (CDR-H2)	residuos 50-66 de SEQ ID NO:196 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:75 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:196 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:181 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:197 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:181 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:197 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:181 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:197 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:92 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:198 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:92 (CDR-H2);	residuos 50-66 de SEQ ID NO:198 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:92 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:198 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:184 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:199 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:184 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:199 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:184 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:199 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:200 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:202 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:200 (CDR-H2);	residuos 50-66 de SEQ ID NO:202 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:200 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:202 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:201 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:203 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:201 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:203 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:201 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:203 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:204 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:206 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:204 (CDR-H2);	residuos 50-66 de SEQ ID NO:206 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:204 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:206 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:205 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:207 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:205 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:207 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:205 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:207 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:208 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:210 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:208 (CDR-H2);	residuos 50-66 de SEQ ID NO:210 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:208 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:210 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:209 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:211 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:209 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:211 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:209 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:211 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:103 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:126 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:103 (CDR-H2);	residuos 50-66 de SEQ ID NO:126 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:103 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:126 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);







ES 2 635 594 T3

residuos 50-66 de SEQ ID NO:124 (CDR-H2);	residuos 50-66 de SEQ ID NO:147 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:124 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:147 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);
residuos 31-35 de SEQ ID NO:125 (CDR-H1);	residuos 31-35 de SEQ ID NO:148 (CDR-H1);
residuos 50-66 de SEQ ID NO:125 (CDR-H2);	residuos 50-66 de SEQ ID NO:148 (CDR-H2);
residuos 99-108 de SEQ ID NO:125 (CDR-H3);	residuos 99-108 de SEQ ID NO:148 (CDR-H3);
residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);
residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);	residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);
residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);	residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3).

Una proteína de unión descrita anteriormente puede comprender al menos tres CDRs, en donde las tres CDRs son de un conjunto de CDRs seleccionado a partir del grupo de conjuntos de CDRs que consiste en:

Conjunto de CDRs	SEQ ID NO.	Conjunto de CDRs	SEQ ID NO.
1	residuos 31-35 de SEQ ID NO:60 (CDR-H1);	55	residuos 31-35 de SEQ ID NO:63 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:60 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:63 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:60 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:63 (CDR-H3);
2	residuos 24-34 de SEQ ID NO:149 (CDR-L1);	56	residuos 24-34 de SEQ ID NO:150 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:149 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:150 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:149 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:150 (CDR-L3);
3	residuos 31-35 de SEQ ID NO:69 (CDR-H1);	57	residuos 31-35 de SEQ ID NO:97 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:69 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:97 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:69 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:97 (CDR-H3);
4	residuos 24-34 de SEQ ID NO:173 (CDR-L1);	58	residuos 24-34 de SEQ ID NO:187 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:173 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:187 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:173 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:187 (CDR-L3);
5	residuos 31-35 de SEQ ID NO:67 (CDR-H1);	59	residuos 31-35 de SEQ ID NO:90 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:67 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:90 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:67 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:90 (CDR-H3);
6	residuos 24-34 de SEQ ID NO:151 (CDR-L1);	60	residuos 24-34 de SEQ ID NO:156 (CDR-L1);

ES 2 635 594 T3

Conjunto de CDRs	SEQ ID NO.	Conjunto de CDRs	SEQ ID NO.
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:151 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:156 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:151 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:156 (CDR-L3);
7	residuos 31-35 de SEQ ID NO:88 (CDR-H1);	61	residuos 31-35 de SEQ ID NO:92 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:88 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:92 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:88 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:92 (CDR-H3);
8	residuos 24-34 de SEQ ID NO:159 (CDR-L1);	62	residuos 24-34 de SEQ ID NO:153 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:159 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:153 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:159 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:153 (CDR-L3);
9	residuos 31-35 de SEQ ID NO:96 (CDR-H1);	63	residuos 31-35 de SEQ ID NO:94 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:96 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:94 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:96 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:94 (CDR-H3);
10	residuos 24-34 de SEQ ID NO:155 (CDR-L1);	64	residuos 24-34 de SEQ ID NO:166 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:155 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:166 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:155 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:166 (CDR-L3);
11	residuos 31-35 de SEQ ID NO:90 (CDR-H1);	65	residuos 31-35 de SEQ ID NO:82 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:90 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:82 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:90 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:82 (CDR-H3);
12	residuos 24-34 de SEQ ID NO:182 (CDR-L1);	66	residuos 24-34 de SEQ ID NO:159 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:182 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:159 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:182 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:159 (CDR-L3);
13	residuos 31-35 de SEQ ID NO:90 (CDR-H1);	67	residuos 31-35 de SEQ ID NO:101 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:90 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:101 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:90 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:101 (CDR-H3);
14	residuos 24-34 de SEQ ID NO:167 (CDR-L1);	68	residuos 24-34 de SEQ ID NO:158 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:167		residuos 50-56 de SEQ ID NO:158

ES 2 635 594 T3

Conjunto de CDRs	SEQ ID NO.	Conjunto de CDRs	SEQ ID NO.
	(CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:167 (CDR-L3);		(CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:158 (CDR-L3);
15	residuos 31-35 de SEQ ID NO:90 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:90 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:90 (CDR-H3);	69	residuos 31-35 de SEQ ID NO:96 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:96 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:96 (CDR-H3);
16	residuos 24-34 de SEQ ID NO:164 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:164 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:164 (CDR-L3);	70	residuos 24-34 de SEQ ID NO:157 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:157 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:157 (CDR-L3);
17	residuos 31-35 de SEQ ID NO:73 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:73 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:73 (CDR-H3);	71	residuos 31-35 de SEQ ID NO:70 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:70 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:70 (CDR-H3);
18	residuos 24-34 de SEQ ID NO:174 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:174 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:174 (CDR-L3);	72	residuos 24-34 de SEQ ID NO:161 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:161 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:161 (CDR-L3);
19	residuos 31-35 de SEQ ID NO:86 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:86 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:86 (CDR-H3);	73	residuos 31-35 de SEQ ID NO:83 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:83 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:83 (CDR-H3);
20	residuos 24-34 de SEQ ID NO:159 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:159 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:159 (CDR-L3);	74	residuos 24-34 de SEQ ID NO:158 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:158 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:158 (CDR-L3);
21	residuos 31-35 de SEQ ID NO:90 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:90 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:90 (CDR-H3);	75	residuos 31-35 de SEQ ID NO:102 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:102 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:102 (CDR-H3);
22	residuos 24-34 de SEQ ID NO:169 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:169 (CDR-L2);	76	residuos 24-34 de SEQ ID NO:185 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:185 (CDR-L2);



ES 2 635 594 T3

Conjunto de CDRs	SEQ ID NO.	Conjunto de CDRs	SEQ ID NO.
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:169 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:185 (CDR-L3);
23	residuos 31-35 de SEQ ID NO:91 (CDR-H1);	77	residuos 31-35 de SEQ ID NO:98 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:91 (CDR-H2)		residuos 50-66 de SEQ ID NO:98 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:91 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:98 (CDR-H3);
24	residuos 24-34 de SEQ ID NO:165 (CDR-L1);	78	residuos 24-34 de SEQ ID NO:160 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:165 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:160 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:165 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:160 (CDR-L3);
25	residuos 31-35 de SEQ ID NO:76 (CDR-H1);	79	residuos 31-35 de SEQ ID NO:74 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:76 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:74 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:76 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:74 (CDR-H3);
26	residuos 24-34 de SEQ ID NO:175 (CDR-L1);	80	residuos 24-34 de SEQ ID NO:186 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:175 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:186 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:175 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:186 (CDR-L3);
27	residuos 31-35 de SEQ ID NO:99 (CDR-H1);	81	residuos 31-35 de SEQ ID NO:95 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:99 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:95 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:99 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:95 (CDR-H3);
28	residuos 24-34 de SEQ ID NO:189 (CDR-L1);	82	residuos 24-34 de SEQ ID NO:157 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:189 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:157 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:189 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:157 (CDR-L3);
29	residuos 31-35 de SEQ ID NO:100 (CDR-H1);	83	residuos 31-35 de SEQ ID NO:72 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:100 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:72 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:100 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:72 (CDR-H3);
30	residuos 24-34 de SEQ ID NO:168 (CDR-L1);	84	residuos 24-34 de SEQ ID NO:178 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:168 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:178 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:168		residuos 89-97 de SEQ ID NO:178

ES 2 635 594 T3

Conjunto de CDRs	SEQ ID NO.	Conjunto de CDRs	SEQ ID NO.
	(CDR-L3);		(CDR-L3);
31	residuos 31-35 de SEQ ID NO:71 (CDR-H1);	85	residuos 31-35 de SEQ ID NO:96 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:71 (CDR-H2)		residuos 50-66 de SEQ ID NO:96 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:71 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:96 (CDR-H3);
32	residuos 24-34 de SEQ ID NO:170 (CDR-L1);	86	residuos 24-34 de SEQ ID NO:163 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:170 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:163 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:170 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:163 (CDR-L3);
33	residuos 31-35 de SEQ ID NO:84 (CDR-H1);	87	residuos 31-35 de SEQ ID NO:77 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:84 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:77 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:84 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:77 (CDR-H3);
34	residuos 24-34 de SEQ ID NO:188 (CDR-L1);	88	residuos 24-34 de SEQ ID NO:183 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:188 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:183 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:188 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:183 (CDR-L3);
35	residuos 31-35 de SEQ ID NO:78 (CDR-H1);	89	residuos 31-35 de SEQ ID NO:90 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:78 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:90 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:78 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:90 (CDR-H3);
36	residuos 24-34 de SEQ ID NO:179 (CDR-L1);	90	residuos 24-34 de SEQ ID NO:171 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:179 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:171 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:179 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:171 (CDR-L3);
37	residuos 31-35 de SEQ ID NO:93 (CDR-H1);	91	residuos 31-35 de SEQ ID NO:79 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:93 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:79 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:93 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:79 (CDR-H3);
38	residuos 24-34 de SEQ ID NO:176 (CDR-L1);	92	residuos 24-34 de SEQ ID NO:180 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:176 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:180 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:176 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:180 (CDR-L3);

ES 2 635 594 T3

Conjunto de CDRs	SEQ ID NO.	Conjunto de CDRs	SEQ ID NO.
39	residuos 31-35 de SEQ ID NO:87 (CDR-H1);	93	residuos 31-35 de SEQ ID NO:381 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:87 (CDR-H2)		residuos 50-66 de SEQ ID NO:381 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:87 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:381 (CDR-H3);
40	residuos 24-34 de SEQ ID NO:154 (CDR-L1);	94	residuos 24-34 de SEQ ID NO:152 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:154 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:152 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:154 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:152 (CDR-L3);
41	residuos 31-35 de SEQ ID NO:85 (CDR-H1);	95	residuos 31-35 de SEQ ID NO:81 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:85 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:81 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:85 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:81 (CDR-H3);
42	residuos 24-34 de SEQ ID NO:162 (CDR-L1);	96	residuos 24-34 de SEQ ID NO:177 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:162 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:177 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:162 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:177 (CDR-L3);
43	residuos 31-35 de SEQ ID NO:89 (CDR-H1);	97	residuos 31-35 de SEQ ID NO:80 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:89 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:80 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:89 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:80 (CDR-H3);
44	residuos 24-34 de SEQ ID NO:170 (CDR-L1);	98	residuos 24-34 de SEQ ID NO:172 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:170 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:172 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:170 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:172 (CDR-L3);
45	residuos 31-35 de SEQ ID NO:75 (CDR-H1);	99	residuos 31-35 de SEQ ID NO:196 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:75 (CDR-H2)		residuos 50-66 de SEQ ID NO:196 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:75 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:196 (CDR-H3);
46	residuos 24-34 de SEQ ID NO:181 (CDR-L1);	100	residuos 24-34 de SEQ ID NO:197 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:181 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:197 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:181 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:197 (CDR-L3);
47	residuos 31-35 de SEQ ID NO:92	101	residuos 31-35 de SEQ ID NO:198

ES 2 635 594 T3

Conjunto de CDRs	SEQ ID NO.	Conjunto de CDRs	SEQ ID NO.
	(CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:92 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:92 (CDR-H3);		(CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:198 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:198 (CDR-H3);
48	residuos 24-34 de SEQ ID NO:184 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:184 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:184 (CDR-L3);	102	residuos 24-34 de SEQ ID NO:199 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:199 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:199 (CDR-L3);
49	residuos 31-35 de SEQ ID NO:200 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:200 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:200 (CDR-H3);	103	residuos 31-35 de SEQ ID NO:202 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:202 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:202 (CDR-H3);
50	residuos 24-34 de SEQ ID NO:201 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:201 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:201 (CDR-L3);	104	residuos 24-34 de SEQ ID NO:203 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:203 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:203 (CDR-L3);
51	residuos 31-35 de SEQ ID NO:204 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:204 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:204 (CDR-H3);	105	residuos 31-35 de SEQ ID NO:206 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:206 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:206 (CDR-H3);
52	residuos 24-34 de SEQ ID NO:205 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:205 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:205 (CDR-L3);	106	residuos 24-34 de SEQ ID NO:207 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:207 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:207 (CDR-L3);
53	residuos 31-35 de SEQ ID NO:208 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:208 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:208 (CDR-H3);	107	residuos 31-35 de SEQ ID NO:210 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:210 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:210 (CDR-H3);
54	residuos 24-34 de SEQ ID NO:209 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:209 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:209 (CDR-L3);	108	residuos 24-34 de SEQ ID NO:211 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:211 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:211 (CDR-L3);
109	residuos 31-35 de SEQ ID NO:103	155	residuos 31-35 de SEQ ID NO:126

ES 2 635 594 T3

Conjunto de CDRs	SEQ ID NO.	Conjunto de CDRs	SEQ ID NO.
	(CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:103 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:103 (CDR-H3);		(CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:126 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:126 (CDR-H3);
110	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);	156	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);
111	residuos 31-35 de SEQ ID NO:104 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:104 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:104 (CDR-H3);	157	residuos 31-35 de SEQ ID NO:127 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:127 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:127 (CDR-H3);
112	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);	158	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);
113	residuos 31-35 de SEQ ID NO:105 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:105 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:105 (CDR-H3);	159	residuos 31-35 de SEQ ID NO:128 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:128 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:128 (CDR-H3);
114	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);	160	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);
115	residuos 31-35 de SEQ ID NO:106 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:106 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:106 (CDR-H3);	161	residuos 31-35 de SEQ ID NO:129 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:129 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:129 (CDR-H3);
116	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);	162	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);
117	residuos 31-35 de SEQ ID NO:107 (CDR-H1);	163	residuos 31-35 de SEQ ID NO:130 (CDR-H1);

ES 2 635 594 T3

Conjunto de CDRs	SEQ ID NO.	Conjunto de CDRs	SEQ ID NO.
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:107 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:130 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:107 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:130 (CDR-H3);
118	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);	164	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);
119	residuos 31-35 de SEQ ID NO:108 (CDR-H1);	165	residuos 31-35 de SEQ ID NO:131 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:108 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:131 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:108 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:131 (CDR-H3);
120	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);	166	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);
121	residuos 31-35 de SEQ ID NO:109 (CDR-H1);	167	residuos 31-35 de SEQ ID NO:132 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:109 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:132 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:109 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:132 (CDR-H3);
122	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);	168	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);
123	residuos 31-35 de SEQ ID NO:110 (CDR-H1);	169	residuos 31-35 de SEQ ID NO:133 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:110 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:133 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:110 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:133 (CDR-H3);
124	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);	170	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);
125	residuos 31-35 de SEQ ID NO:111 (CDR-H1);	171	residuos 31-35 de SEQ ID NO:134 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:111		residuos 50-66 de SEQ ID NO:134

ES 2 635 594 T3

Conjunto de CDRs	SEQ ID NO.	Conjunto de CDRs	SEQ ID NO.
	(CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:111 (CDR-H3);		(CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:134 (CDR-H3);
126	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);	172	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);
127	residuos 31-35 de SEQ ID NO:112 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:112 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:112 (CDR-H3);	173	residuos 31-35 de SEQ ID NO:135 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:135 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:135 (CDR-H3);
128	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);	174	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);
129	residuos 31-35 de SEQ ID NO:113 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:113 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:113 (CDR-H3);	175	residuos 31-35 de SEQ ID NO:136 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:136 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:136 (CDR-H3);
130	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);	176	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);
131	residuos 31-35 de SEQ ID NO:114 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:114 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:114 (CDR-H3);	177	residuos 31-35 de SEQ ID NO:137 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:137 (CDR-H2); residuos 99-108 de SEQ ID NO:137 (CDR-H3);
132	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);	178	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1); residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2); residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);
133	residuos 31-35 de SEQ ID NO:115 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:115 (CDR-H2);	179	residuos 31-35 de SEQ ID NO:138 (CDR-H1); residuos 50-66 de SEQ ID NO:138 (CDR-H2);

ES 2 635 594 T3

Conjunto de CDRs	SEQ ID NO.	Conjunto de CDRs	SEQ ID NO.
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:115 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:138 (CDR-H3);
134	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);	180	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);
135	residuos 31-35 de SEQ ID NO:116 (CDR-H1);	181	residuos 31-35 de SEQ ID NO:139 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:116 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:139 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:116 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:139 (CDR-H3);
136	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);	182	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);
137	residuos 31-35 de SEQ ID NO:117 (CDR-H1);	183	residuos 31-35 de SEQ ID NO:140 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:117 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:140 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:117 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:140 (CDR-H3);
138	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);	184	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);
139	residuos 31-35 de SEQ ID NO:118 (CDR-H1);	185	residuos 31-35 de SEQ ID NO:141 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:118 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:141 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:118 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:141 (CDR-H3);
140	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);	186	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);
141	residuos 31-35 de SEQ ID NO:119 (CDR-H1);	187	residuos 31-35 de SEQ ID NO:142 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:119 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:142 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:119		residuos 99-108 de SEQ ID NO:142



ES 2 635 594 T3

Conjunto de CDRs	SEQ ID NO.	Conjunto de CDRs	SEQ ID NO.
	(CDR-H3);		(CDR-H3);
142	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);	188	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);
143	residuos 31-35 de SEQ ID NO:120 (CDR-H1);	189	residuos 31-35 de SEQ ID NO:143 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:120 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:143 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:120 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:143 (CDR-H3);
144	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);	190	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);
145	residuos 31-35 de SEQ ID NO:121 (CDR-H1);	191	residuos 31-35 de SEQ ID NO:144 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:121 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:144 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:121 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:144 (CDR-H3);
146	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);	192	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);
147	residuos 31-35 de SEQ ID NO:122 (CDR-H1);	193	residuos 31-35 de SEQ ID NO:145 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:122 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:145 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:122 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:145 (CDR-H3);
148	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);	194	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);
149	residuos 31-35 de SEQ ID NO:123 (CDR-H1);	195	residuos 31-35 de SEQ ID NO:146 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:123 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:146 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:123 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:146 (CDR-H3);

ES 2 635 594 T3

Conjunto de CDRs	SEQ ID NO.	Conjunto de CDRs	SEQ ID NO.
150	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);	196	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);
151	residuos 31-35 de SEQ ID NO:124 (CDR-H1);	197	residuos 31-35 de SEQ ID NO:147 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:124 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:147 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:124 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:147 (CDR-H3);
152	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);	198	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);
153	residuos 31-35 de SEQ ID NO:125 (CDR-H1);	199	residuos 31-35 de SEQ ID NO:148 (CDR-H1);
	residuos 50-66 de SEQ ID NO:125 (CDR-H2);		residuos 50-66 de SEQ ID NO:148 (CDR-H2);
	residuos 99-108 de SEQ ID NO:125 (CDR-H3);		residuos 99-108 de SEQ ID NO:148 (CDR-H3);
154	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);	200	residuos 24-34 de SEQ ID NO:59 (CDR-L1);
	residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);		residuos 50-56 de SEQ ID NO:59 (CDR-L2);
	residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);		residuos 89-97 de SEQ ID NO:59 (CDR-L3);

Una proteína de unión descrita anteriormente puede comprender CDRs procedentes de dos conjuntos de CDRs seleccionados a partir del grupo anterior de conjuntos de CDRs.

5 La descripción proporciona una proteína de unión que comprende CDRs procedentes de dos conjuntos de CDRs procedentes del grupo anterior, en donde los dos conjuntos de CDRs se seleccionan a partir del grupo que consiste en:

Conjunto de CDRs 1 y Conjunto de CDRs 2	Conjunto de CDRs 101 y Conjunto de CDRs 102
Conjunto de CDRs 3 y Conjunto de CDRs 4	Conjunto de CDRs 103 y Conjunto de CDRs 104
Conjunto de CDRs 5 y Conjunto de CDRs 6	Conjunto de CDRs 105 y Conjunto de CDRs 106
Conjunto de CDRs 7 y Conjunto de CDRs 8	Conjunto de CDRs 107 y Conjunto de CDRs 108
Conjunto de CDRs 9 y Conjunto de CDRs 10	Conjunto de CDRs 109 y Conjunto de CDRs 110
Conjunto de CDRs 11 y Conjunto de CDRs 12	Conjunto de CDRs 111 y Conjunto de CDRs 112
Conjunto de CDRs 13 y Conjunto de CDRs 14	Conjunto de CDRs 113 y Conjunto de CDRs 114
Conjunto de CDRs 15 y Conjunto de CDRs 16	Conjunto de CDRs 115 y Conjunto de CDRs 116
Conjunto de CDRs 17 y Conjunto de CDRs 18	Conjunto de CDRs 117 y Conjunto de CDRs 118
Conjunto de CDRs 19 y Conjunto de CDRs 20	Conjunto de CDRs 119 y Conjunto de CDRs 120

ES 2 635 594 T3

Conjunto de CDRs 21 y Conjunto de CDRs 22	Conjunto de CDRs 121 y Conjunto de CDRs 122
Conjunto de CDRs 23 y Conjunto de CDRs 24	Conjunto de CDRs 123 y Conjunto de CDRs 124
Conjunto de CDRs 25 y Conjunto de CDRs 26	Conjunto de CDRs 125 y Conjunto de CDRs 126
Conjunto de CDRs 27 y Conjunto de CDRs 28	Conjunto de CDRs 127 y Conjunto de CDRs 128
Conjunto de CDRs 29 y Conjunto de CDRs 30	Conjunto de CDRs 129 y Conjunto de CDRs 130
Conjunto de CDRs 31 y Conjunto de CDRs 32	Conjunto de CDRs 131 y Conjunto de CDRs 132
Conjunto de CDRs 33 y Conjunto de CDRs 34	Conjunto de CDRs 133 y Conjunto de CDRs 134
Conjunto de CDRs 35 y Conjunto de CDRs 36	Conjunto de CDRs 135 y Conjunto de CDRs 136
Conjunto de CDRs 37 y Conjunto de CDRs 38	Conjunto de CDRs 137 y Conjunto de CDRs 138
Conjunto de CDRs 39 y Conjunto de CDRs 40	Conjunto de CDRs 139 y Conjunto de CDRs 140
Conjunto de CDRs 41 y Conjunto de CDRs 42	Conjunto de CDRs 141 y Conjunto de CDRs 142
Conjunto de CDRs 43 y Conjunto de CDRs 44	Conjunto de CDRs 143 y Conjunto de CDRs 144
Conjunto de CDRs 45 y Conjunto de CDRs 46	Conjunto de CDRs 145 y Conjunto de CDRs 146
Conjunto de CDRs 47 y Conjunto de CDRs 48	Conjunto de CDRs 147 y Conjunto de CDRs 148
Conjunto de CDRs 49 y Conjunto de CDRs 50	Conjunto de CDRs 149 y Conjunto de CDRs 150
Conjunto de CDRs 51 y Conjunto de CDRs 52	Conjunto de CDRs 151 y Conjunto de CDRs 152
Conjunto de CDRs 53 y Conjunto de CDRs 54	Conjunto de CDRs 153 y Conjunto de CDRs 154
Conjunto de CDRs 55 y Conjunto de CDRs 56	Conjunto de CDRs 155 y Conjunto de CDRs 156
Conjunto de CDRs 57 y Conjunto de CDRs 58	Conjunto de CDRs 157 y Conjunto de CDRs 158
Conjunto de CDRs 59 y Conjunto de CDRs 60	Conjunto de CDRs 159 y Conjunto de CDRs 160
Conjunto de CDRs 61 y Conjunto de CDRs 62	Conjunto de CDRs 161 y Conjunto de CDRs 162
Conjunto de CDRs 63 y Conjunto de CDRs 64	Conjunto de CDRs 163 y Conjunto de CDRs 164
Conjunto de CDRs 65 y Conjunto de CDRs 66	Conjunto de CDRs 165 y Conjunto de CDRs 166
Conjunto de CDRs 67 y Conjunto de CDRs 68	Conjunto de CDRs 167 y Conjunto de CDRs 168
Conjunto de CDRs 69 y Conjunto de CDRs 70	Conjunto de CDRs 169 y Conjunto de CDRs 170
Conjunto de CDRs 71 y Conjunto de CDRs 72	Conjunto de CDRs 171 y Conjunto de CDRs 172
Conjunto de CDRs 73 y Conjunto de CDRs 74	Conjunto de CDRs 173 y Conjunto de CDRs 174
Conjunto de CDRs 75 y Conjunto de CDRs 76	Conjunto de CDRs 175 y Conjunto de CDRs 176
Conjunto de CDRs 77 y Conjunto de CDRs 78	Conjunto de CDRs 177 y Conjunto de CDRs 178
Conjunto de CDRs 79 y Conjunto de CDRs 80	Conjunto de CDRs 179 y Conjunto de CDRs 180
Conjunto de CDRs 81 y Conjunto de CDRs 82	Conjunto de CDRs 181 y Conjunto de CDRs 182
Conjunto de CDRs 83 y Conjunto de CDRs 84	Conjunto de CDRs 183 y Conjunto de CDRs 184
Conjunto de CDRs 85 y Conjunto de CDRs 86	Conjunto de CDRs 185 y Conjunto de CDRs 186
Conjunto de CDRs 87 y Conjunto de CDRs 88	Conjunto de CDRs 187 y Conjunto de CDRs 188
Conjunto de CDRs 89 y Conjunto de CDRs 90	Conjunto de CDRs 189 y Conjunto de CDRs 190
Conjunto de CDRs 91 y Conjunto de CDRs 92	Conjunto de CDRs 191 y Conjunto de CDRs 192
Conjunto de CDRs 93 y Conjunto de CDRs 94	Conjunto de CDRs 193 y Conjunto de CDRs 194
Conjunto de CDRs 95 y Conjunto de CDRs 96	Conjunto de CDRs 195 y Conjunto de CDRs 196
Conjunto de CDRs 97 y Conjunto de CDRs 98	Conjunto de CDRs 197 y Conjunto de CDRs 198
Conjunto de CDRs 99 y Conjunto de CDRs 100	Conjunto de CDRs 199 y Conjunto de CDRs 200

Una proteína de unión descrita anteriormente puede comprender además una región estructural aceptora humana.

Preferiblemente, la región estructural humana comprende un grupo seleccionado a partir de secuencias de aminoácidos que consiste en SEQ ID NOs: 7-10, 13-16, 25, 240-316 y 317-381. Una proteína de unión puede comprender una secuencia de una región estructural humana seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 7-10 y 13-16.

5 Las proteínas de unión de la descripción incluyen las que comprenden una región estructural aceptora humana que comprende al menos una sustitución de aminoácidos en la región estructural, en donde la secuencia de aminoácidos de la región estructural es al menos 65% idéntica a la secuencia de dicha región estructural aceptora humana y comprende al menos 70 residuos de aminoácidos idénticos a dicha región estructural aceptora humana.

10 Una proteína de unión de la descripción comprende una región estructural aceptora humana, en donde dicha región estructural aceptora humana comprende al menos una sustitución de aminoácidos en la región estructural en un residuo clave, en donde dicho residuo clave se selecciona a partir del grupo que consiste en un residuo adyacente a una CDR; un residuo del sitio de glicosilación; un residuo raro; un residuo capaz de interactuar con IL-1 $\beta$  humana; un residuo capaz de interactuar con una CDR; un residuo canónico; un residuo de contacto entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera; un residuo dentro de una zona de Vernier; y un residuo en una región que se solapa entre una CDR1 de la cadena pesada variable definida por Chothia y una primera región estructural de la cadena pesada definida por Kabat. Por ejemplo, una proteína de unión puede comprender un residuo clave, en donde dicho residuo clave se selecciona a partir del grupo que consiste en: 2H, 4H, 24H, 26H, 27H, 29H, 34H, 35H, 37H, 39H, 44H, 45H, 47H, 48H, 49H, 50H, 51H, 58H, 59H, 60H, 63H, 67H, 69H, 71H, 73H, 76H, 78H, 91H, 93H, 94H, 2L, 4L, 25L, 29L, 27BL, 33L, 34L, 36L, 38L, 43L, 44L, 46L, 47L, 48L, 49L, 55L, 58L, 62L, 64L, 71L, 87L, 89L, 90L, 91L, 94L, 95L (todos con la numeración de Kabat). Un subconjunto ejemplar de estos residuos para la humanización de una proteína de unión de la invención consiste en 27H, 48H, 67H, 69H, 93H, 36L, 43L, 46L, 47L, 49L, 58L, 71L y 87L.

Una proteína de unión de la descripción puede comprender un dominio variable humano de consenso.

25 Una proteína de unión a IL-1 $\beta$  de la descripción puede comprender al menos un dominio variable que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 60-189.

Una proteína de unión de la invención puede comprender al menos una región (o dominio) variable de la cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 60-148, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208 y 210.

30 Una proteína de unión de acuerdo con la descripción puede comprender al menos una región (o dominio) variable de la cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 149-189.

35 Una proteína de unión de acuerdo con la descripción puede comprender al menos una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 60-148, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208 y 210 y al menos una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 149-189, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209 y 211.

Una proteína de unión de acuerdo con la descripción puede comprender dos dominios variables, en donde los dos dominios variables comprenden secuencias de aminoácidos seleccionadas a partir del grupo que consiste en:

SEQ ID NO:60 y SEQ ID NO:149	SEQ ID NO:198 y SEQ ID NO:199
SEQ ID NO:69 y SEQ ID NO:173	SEQ ID NO:202 y SEQ ID NO:203
SEQ ID NO:67 y SEQ ID NO:151	SEQ ID NO:206 y SEQ ID NO:207
SEQ ID NO:88 y SEQ ID NO:159	SEQ ID NO:210 y SEQ ID NO:211
SEQ ID NO:96 y SEQ ID NO:155	SEQ ID NO:103 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:90 y SEQ ID NO:182	SEQ ID NO:104 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:90 y SEQ ID NO:167	SEQ ID NO:105 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:90 y SEQ ID NO:164	SEQ ID NO:106 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:73 y SEQ ID NO:174	SEQ ID NO:107 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:86 y SEQ ID NO:159	SEQ ID NO:108 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:90 y SEQ ID NO:169	SEQ ID NO:109 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:91 y SEQ ID NO:165	SEQ ID NO:110 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:76 y SEQ ID NO:175	SEQ ID NO:111 y SEQ ID NO:59

ES 2 635 594 T3

SEQ ID NO:99 y SEQ ID NO:189	SEQ ID NO:112 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:100 y SEQ ID NO:168	SEQ ID NO:113 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:71 y SEQ ID NO:170	SEQ ID NO:114 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:84 y SEQ ID NO:188	SEQ ID NO:115 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:78 y SEQ ID NO:179	SEQ ID NO:116 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:93 y SEQ ID NO:176	SEQ ID NO:117 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:87 y SEQ ID NO:154	SEQ ID NO:118 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:85 y SEQ ID NO:162	SEQ ID NO:119 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:89 y SEQ ID NO:170	SEQ ID NO:120 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:75 y SEQ ID NO:181	SEQ ID NO:121 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:92 y SEQ ID NO:184	SEQ ID NO:122 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:200 y SEQ ID NO:201	SEQ ID NO:123 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:204 y SEQ ID NO:205	SEQ ID NO:124 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:208 y SEQ ID NO:209	SEQ ID NO:125 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:63 y SEQ ID NO:150	SEQ ID NO:126 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:97 y SEQ ID NO:187	SEQ ID NO:127 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:90 y SEQ ID NO:156	SEQ ID NO:128 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:92 y SEQ ID NO:153	SEQ ID NO:129 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:94 y SEQ ID NO:166	SEQ ID NO:130 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:82 y SEQ ID NO:159	SEQ ID NO:131 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:101 y SEQ ID NO:158	SEQ ID NO:132 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:96 y SEQ ID NO:157	SEQ ID NO:133 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:70 y SEQ ID NO:161	SEQ ID NO:134 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:83 y SEQ ID NO:158	SEQ ID NO:135 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:102 y SEQ ID NO:185	SEQ ID NO:136 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:98 y SEQ ID NO:160	SEQ ID NO:137 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:74 y SEQ ID NO:186	SEQ ID NO:138 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:95 y SEQ ID NO:157	SEQ ID NO:139 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:72 y SEQ ID NO:178	SEQ ID NO:140 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:96 y SEQ ID NO:163	SEQ ID NO:141 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:77 y SEQ ID NO:183	SEQ ID NO:142 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:90 y SEQ ID NO:171	SEQ ID NO:143 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:79 y SEQ ID NO:180	SEQ ID NO:144 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:381 y SEQ ID NO:152	SEQ ID NO:145 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:81 y SEQ ID NO:177	SEQ ID NO:146 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:80 y SEQ ID NO:172	SEQ ID NO:147 y SEQ ID NO:59
SEQ ID NO:196 y SEQ ID NO:197	SEQ ID NO:148 y SEQ ID NO:59

En otra realización, una proteína que se une a IL-1 $\beta$  descrita en el presente documento se selecciona entre el grupo que consiste en: una molécula de inmunoglobulina, un scFv, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un fragmento Fab, un fragmento Fab', un F(ab')<sub>2</sub>, un Fv y un Fv unido con disulfuro.

5

En un aspecto de la descripción, una proteína de unión descrita en el presente documento es capaz de modular una

función biológica de IL-1. En otro aspecto, una proteína de unión descrita en este documento es capaz de neutralizar una IL-1.

5 En una realización, una proteína de unión descrita en este documento tiene una constante de tasa de asociación ( $K_{on}$ ) para IL-1 $\beta$  seleccionada a partir del grupo que consiste en: al menos aproximadamente  $10^2$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>; al menos aproximadamente  $10^3$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>; al menos aproximadamente  $10^4$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>; al menos aproximadamente  $10^5$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>; y al menos aproximadamente  $10^6$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>; tal y como se mide por resonancia de plasmón superficial.

10 En otra realización, una proteína de unión descrita en este documento tiene una constante de tasa de disociación ( $K_{off}$ ) para IL-1 $\beta$  seleccionada a partir del grupo que consiste en: como máximo aproximadamente  $10^{-3}$  s<sup>-1</sup>; como máximo aproximadamente  $10^{-4}$  s<sup>-1</sup>; como máximo aproximadamente  $10^{-5}$  s<sup>-1</sup>; y como máximo aproximadamente  $10^{-6}$  s<sup>-1</sup>, tal y como se mide por resonancia de plasmón superficial.

15 En otra realización, una proteína de unión descrita en este documento tiene una constante de disociación ( $K_D$ ) para IL-1 $\beta$  seleccionada a partir del grupo que consiste en: como máximo aproximadamente  $10^{-7}$  M; como máximo aproximadamente  $10^{-8}$  M; como máximo aproximadamente  $10^{-9}$  M; como máximo aproximadamente  $10^{-10}$  M; como máximo aproximadamente  $10^{-11}$  M; como máximo aproximadamente  $10^{-12}$  M; y como máximo  $10^{-13}$  M.

20 En un aspecto, la descripción proporciona una estructura artificial de proteína de unión que comprende una proteína de unión descrita en este documento y comprende además un enlazador o un dominio constante de inmunoglobulina. La estructura artificial de proteína de unión puede comprender una proteína de unión, en donde la proteína de unión se selecciona a partir del grupo que consiste en: una molécula de inmunoglobulina, un Fv unido por disulfuro, un anticuerpo monoclonal, un scFv, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado con CDR, un diacuerpo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo multiespecífico, un Fab, un anticuerpo de doble especificidad, un Fab', un anticuerpo biespecífico y un F(ab')<sub>2</sub>, una DVD-Ig<sup>®</sup> y un Fv.

25 En una realización, una estructura artificial de proteína de unión comprende un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina seleccionado a partir del grupo que consiste en un dominio constante de IgM humana, un dominio constante de IgG4 humana, un dominio constante de IgG1 humana, un dominio constante de IgE humana, un dominio constante de IgG2 humana y un dominio constante de IgG3 humana y un dominio constante de IgA humana.

En otra realización, una estructura artificial de proteína de unión comprende un dominio constante de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

30 La descripción también proporciona un conjugado de proteína de unión que comprende una estructura artificial de proteína de unión descrita en el presente documento y además comprende un agente seleccionado a partir del grupo que consiste en una molécula de inmunoadhesión, un agente de formación de imágenes, un agente terapéutico y un agente citotóxico. Los agentes formadores de imágenes que son útiles como restos de agentes en la unión de conjugados de proteína descritos en el presente documento, incluyen, pero no se limitan a, un radiomarcador, una enzima, un marcador fluorescente, un marcador luminiscente, un marcador bioluminiscente, un marcador magnético y biotina. En una realización, un radiomarcador se selecciona a partir del grupo que consiste en: <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>35</sup>S, <sup>90</sup>Y, <sup>99</sup>Tc, <sup>111</sup>In, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>177</sup>Lu, <sup>166</sup>Ho y <sup>153</sup>Sm.

35 En otra realización, un conjugado de proteína de unión comprende un agente que es un agente terapéutico o citotóxico seleccionado a partir del grupo que consiste en: un anti-metabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citocina, un agente anti-angiogénico, un agente anti-mitótico, una antraciclina, una toxina y un agente apoptótico.

En una realización, una proteína de unión, una estructura artificial de proteína de unión o un conjugado de proteína de unión descrito en el presente documento, posee un patrón de glicosilación humano.

45 Las proteínas de unión, las estructuras artificiales de proteína de unión y los conjugados de proteína de unión descritos en el presente documento, pueden existir como proteínas solubles o como cristales. En una realización, tales cristales son cristales liberados, controlados por agentes farmacéuticos exentos de vehículo. En otra realización, una forma cristalina de una proteína de unión, una estructura artificial de proteína de unión o un conjugado de proteína de unión descrito en el presente documento, tiene una semivida *in vivo* mayor que su homólogo soluble. En otra realización, un cristal de una proteína de unión, una estructura artificial de proteína de unión o un conjugado de proteína de unión descrito en el presente documento, conserva la actividad biológica de su homólogo soluble.

50 Las composiciones de la descripción incluyen una composición para la liberación de una proteína de unión, una estructura artificial de proteína de unión o un conjugado de proteína de unión cristalizado, descrito en este documento, que comprende:

55 (a) una formulación, en donde dicha formulación comprende una proteína de unión, una estructura artificial de proteína de unión o un conjugado de proteína de unión cristalizado, descrito en este documento y un

ingrediente; y

(b) al menos un vehículo polimérico.

Los vehículos polímeros útiles en composiciones de la descripción incluyen, sin limitación, uno o varios del grupo que consiste en: poli(ácido acrílico), poli(cianoacrilatos), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(depsipéptido), poli(ésteres), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli(b-hidroxibutirato), poli(caprolactona), poli(dioxanona); poli(etilenglicol), poli((hidroxipropil)metacrilamida, poli[(organo) fosfaceno], poli(orto-ésteres), poli(alcohol vinílico), poli(vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maleico-alquil vinil éter, polioles plurónicos, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, mezclas y copolímeros de los mismos.

En otro aspecto, un ingrediente de una composición de la descripción se selecciona a partir del grupo que consiste en albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, metoxipolietilenglicol y polietilenglicol.

La descripción también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de unión, una estructura artificial de proteína de unión o un conjugado de proteína de unión descrito en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender además al menos un agente adicional. En una realización, un agente adicional de este tipo incluye, pero no se limita a, un agente terapéutico, agente de formación de imágenes, agente citotóxico, inhibidores de la angiogénesis; inhibidores de cinasas; bloqueadores de moléculas coestimuladoras; bloqueadores de moléculas de adhesión; anticuerpo anti-citocina o un fragmento funcional del mismo; metotrexato; ciclosporina; rapamicina; FK506; marcador o indicador detectable; un antagonista de TNF; un agente antirreumático; un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un agente antimicrobiano, un agente antipsoriático, un corticosteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, un agente de inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un fármaco de sustitución hormonal, un agente radiofarmacéutico, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, una medicación contra el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, una epinefrina o un análogo, una citocina y un antagonista de citocina.

En una realización, una composición farmacéutica de la invención comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el vehículo también sirve como un adyuvante para aumentar la absorción o la dispersión de la proteína de unión, la estructura artificial de proteína de unión o el conjugado de proteína de unión en la composición. Un adyuvante ejemplar es la hialuronidasa.

En otra realización, una composición farmacéutica comprende además al menos un agente terapéutico adicional para tratar un trastorno en el que la actividad de IL-1 $\beta$  es perjudicial.

En una realización, la descripción proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican una o varias secuencias de aminoácidos de una proteína de unión descrita en el presente documento. Tales ácidos nucleicos pueden insertarse en un vector para llevar a cabo diversos análisis genéticos o para expresar, caracterizar o mejorar una o varias propiedades de una proteína de unión descrita en el presente documento. Un vector puede comprender una o varias moléculas de ácido nucleico que codifican una o varias secuencias de aminoácidos de una proteína de unión descrita en el presente documento, en donde una o varias de las moléculas de ácido nucleico están ligadas funcionalmente a secuencias transcripcionales y/o traduccionales apropiadas que permiten la expresión de la proteína de unión en una célula hospedadora particular que es portadora del vector. Ejemplos de vectores para la clonación o la expresión de ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos de proteínas de unión descritas en este documento, incluyen, pero no se limitan, pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV y pBJ.

La descripción también proporciona una célula hospedadora que comprende un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una o varias secuencias de aminoácidos de una proteína de unión descrita en el presente documento. Las células hospedadoras útiles en la invención pueden ser procariontas o eucariotas. Una célula hospedadora procarionta a modo de ejemplo es *Escherichia coli*. Las células eucariotas útiles como células hospedadoras en la invención incluyen células protistas, células animales, células vegetales y células fúngicas. Una célula fúngica ejemplar es una célula de levadura, incluyendo *Saccharomyces cerevisiae*. Una célula animal ejemplar útil como célula hospedadora de acuerdo con la invención incluye, pero no se limita a, una célula de mamífero, una célula aviar y una célula de insecto. Las células de mamífero preferidas incluyen células CHO y COS. Una célula de insecto útil como célula hospedadora de acuerdo con la invención, es una célula Sf9 de insecto.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para producir una proteína de unión descrita en este documento que comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un vector que codifica la proteína de unión, en un medio de cultivo en condiciones suficientes para producir la proteína de unión capaz de unirse a IL-1 $\alpha$  y/o IL-1 $\beta$ . La proteína producida de este modo se puede aislar y utilizar en diversas composiciones y métodos descritos en este documento.

En otra realización, la descripción proporciona un método para reducir la actividad de IL-1 humana que comprende poner en contacto IL-1 humana con una proteína de unión descrita en el presente documento, de tal manera que la

actividad de IL-1 humana se reduce.

Otra realización de la invención permite un método para tratar un sujeto debido a un trastorno, mediante la administración al sujeto de una proteína de unión descrita en este documento, de tal manera que se consigue ese tratamiento.

- 5 En otra realización, una proteína de unión descrita en el presente documento es útil para tratar un trastorno seleccionado a partir del grupo que consiste en: diabetes; uveítis; dolor neuropático; dolor artrósico; dolor inflamatorio; artritis reumatoide; osteoartritis; artritis crónica juvenil; artritis séptica; artritis de Lyme; artritis psoriásica; artritis reactiva; espondiloartropatía; lupus eritematoso sistémico (SLE); enfermedad de Crohn; colitis ulcerosa; enfermedad inflamatoria intestinal; diabetes autoinmune; diabetes mellitus insulino dependiente; tiroiditis; asma; enfermedades alérgicas; psoriasis; dermatitis; esclerodermia; enfermedad de injerto frente a hospedador; rechazo de trasplante de órganos; enfermedad inmune aguda asociada con trasplante de órganos; enfermedad inmune crónica asociada con trasplante de órganos; sarcoidosis; aterosclerosis; coagulación intravascular diseminada (DIC); enfermedad de Kawasaki; enfermedad de Graves; síndrome nefrótico; síndrome de fatiga crónica; granulomatosis de Wegener; púrpura de Henoch-Schoenlein; vasculitis microscópica de los riñones; hepatitis activa crónica; uveítis autoinmune; choque séptico; síndrome de choque tóxico; síndrome de septicemia; caquexia; enfermedades infecciosas; enfermedades parasitarias; mielitis transversa aguda; corea de Huntington; enfermedad de Parkinson; enfermedad de Alzheimer; ictus; cirrosis biliar primaria; anemia hemolítica; tumores malignos; insuficiencia cardíaca; infarto de miocardio; enfermedad de Addison; deficiencia poliglandular esporádica de tipo I; deficiencia poliglandular de tipo II (síndrome de Schmidt); síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA); alopecia; alopecia areata; artropatía seronegativa; artropatía; enfermedad de Reiter; artropatía psoriásica; artropatía colítica ulcerosa; sinovitis enteropática; clamidia; artropatía asociada a *Yersinia* y *Salmonella*; espondiloartropatía; enfermedad ateromatosa/arteriosclerosis; alergia atópica; enfermedad ampollosa autoinmunitaria; pénfigo vulgar; pénfigo foliáceo; penfigoide; enfermedad de IgA lineal; anemia hemolítica autoinmune; anemia hemolítica positiva de Coombs; anemia perniciosa adquirida; anemia perniciosa juvenil; encefalitis miálgica/enfermedad de Royal Free; candidiasis mucocutánea crónica; arteritis de células gigantes (GCA); hepatitis esclerosante primaria; hepatitis autoinmune criptogénica; síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA); enfermedades relacionadas con la inmunodeficiencia adquirida; hepatitis B; hepatitis C; inmunodeficiencia variada común (hipogammaglobulinemia variable común); miocardiopatía dilatada; infertilidad femenina; insuficiencia ovárica; insuficiencia ovárica prematura; enfermedad pulmonar fibrótica; alveolitis fibrosante criptogénica; enfermedad pulmonar intersticial post-inflamatoria; neumonitis intersticial; enfermedad pulmonar intersticial asociada con enfermedad del tejido conectivo; enfermedad pulmonar asociada con enfermedad mixta del tejido conectivo; enfermedad pulmonar intersticial asociada con esclerosis sistémica; enfermedad pulmonar intersticial asociada con artritis reumatoide; enfermedad pulmonar asociada con lupus eritematoso sistémico; enfermedad pulmonar asociada con dermatomiositis/polimiositis; enfermedad pulmonar asociada con enfermedad de Sjögren; enfermedad pulmonar asociada con espondilitis anquilosante; enfermedad pulmonar difusa vasculítica; enfermedad pulmonar asociada con hemosiderosis; enfermedad pulmonar intersticial inducida por fármacos; fibrosis; fibrosis por radiación; bronquiolitis obliterante; neumonía eosinofílica crónica; enfermedad infiltrativa pulmonar linfocítica; enfermedad pulmonar intersticial postinfecciosa; artritis por gota; hepatitis autoinmune; hepatitis autoinmune de tipo 1 (autoinmune clásica o hepatitis lupoides); hepatitis autoinmune de tipo 2 (hepatitis por anticuerpo anti-LKM); hipoglucemia mediada por autoanticuerpos; resistencia a la insulina de tipo B con acantosis nigricans; hipoparatiroidismo; osteoartritis; colangitis esclerosante primaria; psoriasis de tipo 1; psoriasis de tipo 2; leucopenia idiopática; neutropenia autoinmune; enfermedad renal NOS; glomerulonefritis; vasculitis microscópica de los riñones; enfermedad de Lyme; lupus eritematoso discoide; infertilidad masculina idiopática; infertilidad masculina asociada con óxido nítrico; autoinmunidad del esperma; esclerosis múltiple (todos los subtipos, incluyendo progresiva primaria, progresiva secundaria, remitente recidivante); oftalmía simpática; hipertensión pulmonar secundaria a enfermedad del tejido conectivo; síndrome de Goodpasture; manifestación pulmonar de poliarteritis nodosa; fiebre reumática aguda; espondilitis reumatoide; enfermedad de Still; esclerosis sistémica; síndrome de Sjögren; enfermedad/arteritis de Takayasu; trombocitopenia autoinmune (AITP); trombocitopenia idiopática; enfermedad tiroidea autoinmune; hipertiroidismo; hipotiroidismo autoinmune del bocio (enfermedad de Hashimoto); hipotiroidismo autoinmune atrófico; mixedema primario; uveítis facogénica; vasculitis primaria; vitiligo; enfermedad hepática aguda; enfermedad crónica del hígado; cirrosis alcohólica; lesión hepática inducida por el alcohol; colestasis; enfermedad hepática idiosincrásica; hepatitis inducida por fármacos; esteatohepatitis no alcohólica; alergia; infección con estreptococos del grupo B (GBS); trastornos mentales (por ejemplo, depresión y esquizofrenia); enfermedades mediadas por los tipos Th2 y Th1; dolor agudo y crónico (diferentes formas de dolor); cáncer (tal como cáncer de pulmón, mama, estómago, vejiga, colon, páncreas, ovario, próstata y rectal); tumores malignos hematopoyéticos; leucemia; linfoma; abetalipoproteinemia; acrocianosis; procesos parasitarios o infecciosos agudos y crónicos; leucemia aguda; leucemia linfoblástica aguda (LLA); LLA de linfocitos T; LLA de FAB; leucemia mielóide aguda (AML); infección bacteriana aguda o crónica; pancreatitis aguda; fallo renal agudo; adenocarcinomas; latidos ectópicos auriculares; complejo de demencia y SIDA; hepatitis inducida por el alcohol; conjuntivitis alérgica; dermatitis de contacto alérgica; rinitis alérgica; rechazo de aloinjerto; deficiencia de antitripsina alfa-I; esclerosis lateral amiotrófica; anemia; angina de pecho; degeneración de las células del asta anterior; terapia anti-CD3; síndrome antifosfolípido; reacciones de hipersensibilidad anti-receptor; aneurismas aórticos y periféricos; disección aórtica; hipertensión arterial; arteriosclerosis; fístula arteriovenosa; ataxia; fibrilación auricular (sostenida o paroxística); aleteo auricular; bloqueo auriculoventricular; linfoma de linfocitos B; rechazo de injerto de hueso; rechazo de trasplante de médula ósea



(BMT); bloqueo de rama; linfoma de Burkitt; quemaduras; arritmias cardíacas; síndrome de aturdimiento cardíaco; tumores cardíacos; cardiomiopatía; respuesta inflamatoria a derivación cardiopulmonar; rechazo de trasplante de cartílago; degeneraciones corticales cerebelares; trastornos cerebelosos; taquicardia auricular caótica o multifocal; trastornos asociados a la quimioterapia; leucemia mielocítica crónica (CML); alcoholismo crónico; patologías inflamatorias crónicas; leucemia linfocítica crónica (CLL); enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); intoxicación con salicilato crónica; carcinoma colorrectal; insuficiencia cardíaca congestiva; conjuntivitis; dermatitis de contacto; cor pulmonale; enfermedad de la arteria coronaria; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; septicemia negativa de cultivo; fibrosis quística; trastornos asociados con terapia de citocinas; demencia pugilística; enfermedades desmielinizantes; fiebre hemorrágica del dengue; dermatitis; alteraciones dermatológicas; diabetes mellitus; enfermedad arteriosclerótica diabética; enfermedad difusa de cuerpos de Lewy; miocardiopatía dilatada congestiva; trastornos de los ganglios basales; síndrome de Down en la mediana edad; trastornos del movimiento inducidos por fármacos que bloquean los receptores de dopamina del SNC; sensibilidad a los fármacos; eczema; encefalomiелitis; endocarditis; endocrinopatía; epiglotitis; infección con el virus Epstein-Barr; eritromialgia; trastornos extrapiramidales y cerebelosos; linfocitosis hemofagocítica familiar; rechazo de implante de timo fetal; ataxia de Friedrich; trastornos arteriales periféricos funcionales; septicemia fúngica; gangrena gaseosa; úlcera gástrica; nefritis glomerular; rechazo del injerto de cualquier órgano o tejido; septicemia gram negativa; septicemia gram positiva; granulomas debidos a organismos intracelulares; leucemia de células pilosas; enfermedad de Hallervorden-Spatz; tiroiditis de Hashimoto; fiebre del heno; rechazo de trasplante de corazón; hemocromatosis; hemodiálisis; síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombótica; hemorragia; hepatitis A; arritmias de rama His; infección por VIH/neuropatía por VIH; enfermedad de Hodgkin; trastornos del movimiento hiperkinéticos; reacciones de hipersensibilidad; neumonitis por hipersensibilidad; hipertensión; trastornos de movimiento hipocinéticos; evaluación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal; enfermedad de Addison idiopática; fibrosis pulmonar idiopática (IPF); citotoxicidad mediada por anticuerpos; astenia; atrofia muscular espinal infantil; inflamación de la aorta; gripe A; exposición a radiación ionizante; iridociclitis/uveítis/neuritis óptica; lesión por isquemia-reperusión; ictus isquémico; artritis reumatoide juvenil; atrofia muscular espinal juvenil; sarcoma de Kaposi; rechazo de trasplante de riñón; legionella; leishmaniasis; lepra; lesiones del sistema corticoespinal; lipedema; rechazo de trasplante de hígado; linfedema; malaria; linfoma maligno; histiocitosis maligna; melanoma maligno; meningitis; meningococcemia; dolor de cabeza migraña por síndrome metabólico; dolor de cabeza migraña idiopática; trastorno multisistémico mitocondrial; enfermedad mixta del tejido conectivo; gammapatía monoclonal; mieloma múltiple; degeneraciones de múltiples sistemas (Menzel; Dejerine-Thomas; Shy-Drager y Machado-Joseph); miastenia grave; mycobacterium avium intracellulare; tuberculosis micobacteriana; síndrome mielodisplásico; infarto de miocardio; trastornos isquémicos de miocardio; carcinoma nasofaríngeo; enfermedad pulmonar crónica neonatal; nefritis; nefrosis; enfermedades neurodegenerativas; atrofas musculares neurogénicas I; neutropenia febril; linfoma no Hodgkin; oclusión de la aorta abdominal y sus ramas; trastornos arteriales oclusivos; terapia OKT3®; orquitis/epididimitis; procedimientos de reversión de orquitis/vasectomía; organomegalia; osteoporosis; rechazo de trasplante de páncreas; carcinoma de páncreas; síndrome paraneoplásico/hipercalcemia de malignidad; rechazo de trasplante de paratiroides; enfermedad inflamatoria pélvica; rinitis perenne; enfermedad pericárdica; enfermedad aterosclerótica periférica; trastornos vasculares periféricos; peritonitis; anemia perniciosa; neumonía por *Pneumocystis carinii*; neumonía; síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammapatía monoclonal y síndrome de cambios en la piel); síndrome posterior a perfusión; síndrome posterior a bomba; síndrome de cardiectomía post-MI; preeclampsia; parálisis de supranúcleo progresiva; hipertensión pulmonar primaria; terapia de radiación; fenómeno de Raynaud; enfermedad de Raynaud; enfermedad de Refsum; taquicardia regular estrecha QRS; hipertensión renovascular; lesión por reperusión; cardiomiopatía restrictiva; sarcomas; corea senil; demencia senil de tipo cuerpos de Lewy; artropatías seronegativas; choque; anemia falciforme; rechazo de aloinjertos de piel; síndrome de cambios de piel; rechazo de trasplante de intestino delgado; tumores sólidos; arritmias específicas; ataxia espinal; degeneraciones espinocerebelares; miositis estreptocócica; lesiones estructurales del cerebelo; panencefalitis esclerosante subaguda; síncope; sífilis del sistema cardiovascular; anafilaxia sistémica; síndrome de respuesta inflamatoria sistémica; artritis reumatoide juvenil de inicio sistémico; telangiectasia; tromboangitis ocluyente; trombocitopenia; toxicidad; trasplantes; trauma/hemorragia; reacciones de hipersensibilidad de tipo III; hipersensibilidad de tipo IV; angina inestable; uremia; septicemia urinaria; urticaria; enfermedades cardíacas valvulares; venas varicosas; vasculitis; enfermedades venosas; trombosis venosa; fibrilación ventricular; infecciones víricas y fúngicas; encefalitis vírica/meningitis aséptica; síndrome hemofagocítico asociado vírico; síndrome de Wernicke-Korsakoff; enfermedad de Wilson; rechazo de xenoinjerto de cualquier órgano o tejido; síndromes coronarios agudos; polineuritis aguda idiopática; polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria aguda; isquemia aguda; enfermedad de Still del adulto; alopecia areata; anafilaxia; síndrome de anticuerpos anti-fosfolípido; anemia aplásica; arteriosclerosis; eczema atópico; dermatitis atópica; dermatitis autoinmune; trastorno autoinmune asociado con infección de *Streptococcus*; enteropatía autoinmune; pérdida de la audición autoinmune; síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS); miocarditis autoinmune; insuficiencia ovárica prematura autoinmune; blefaritis; bronquiectasias; penfigoide ampollar; enfermedad cardiovascular; síndrome antifosfolípido catastrófico; enfermedad celíaca; espondilosis cervical; isquemia crónica; penfigoide cicatricial; síndrome clínicamente aislado (CIS) con riesgo de esclerosis múltiple; conjuntivitis; trastorno psiquiátrico de inicio en la infancia; dacriocistitis; dermatomiositis; retinopatía diabética; hernia de disco; prolapso de disco; anemia hemolítica inmune inducida por fármacos; endocarditis; endometriosis; endoftalmítis; epiescleritis; eritema multiforme; eritema multiforme mayor; penfigoide gestacional; síndrome de Guillain-Barré (GBS); fiebre del heno; síndrome de Hughes; enfermedad de Parkinson idiopática; neumonía intersticial idiopática; alergia mediada por IgE; anemia hemolítica inmune; miositis por cuerpos de inclusión; enfermedad inflamatoria ocular infecciosa; enfermedad desmielinizante inflamatoria;

enfermedad cardíaca inflamatoria; enfermedad renal inflamatoria; iritis; queratitis; queratoconjuntivitis seca; enfermedad de Kussmaul o enfermedad de Kussmaul-Meier; parálisis de Landry; histiocitosis de células de Langerhans; livedo reticularis; degeneración macular; poliangeitis microscópica; Morbus Bechterev; trastornos de las neuronas motoras; penfigoide de la membrana mucosa; fallo multiorgánico; miastenia grave; síndrome mielodisplásico; miocarditis; trastornos de la raíz nerviosa; neuropatía; hepatitis no A no B; neuritis óptica; osteolisis; JRA pauciarticular; enfermedad oclusiva arterial periférica (EAOP); enfermedad vascular periférica (PVD); enfermedad arterial periférica (PAD); flebitis; poliarteritis nodosa (o periarteritis nodosa); policondritis; polimialgia reumática; poliosis; JRA poliarticular; síndrome de deficiencia poliendocrina; polimiositis; polimialgia reumática (PMR); síndrome de post-bomba; parkinsonismo primario; parkinsonismo secundario; prostatitis; aplasia pura de glóbulos rojos; insuficiencia suprarrenal primaria; neuromielitis óptica recurrente; reestenosis; cardiopatía reumática; SAPHO (sinovitis, acné, pustulosis, hiperostosis y osteitis); amiloidosis secundaria; choque pulmonar; escleritis; ciática; insuficiencia suprarrenal secundaria; enfermedad del tejido conectivo asociada a silicona; dermatosis de Sneddon-Wilkinson; espondilitis anquilosante; síndrome de Stevens-Johnson (SJS); síndrome de respuesta inflamatoria sistémica; arteritis temporal; retinitis toxoplásmica; necrolisis epidérmica tóxica; mielitis transversa; TRAPS (síndrome periódico asociado al receptor del factor de necrosis tumoral de tipo 1 (TNFR)); resistencia a la insulina de tipo B con acantosis nigricans; reacción alérgica de tipo 1; diabetes de tipo II; urticaria; neumonía intersticial usual (UIP); conjuntivitis vernal; retinitis vírica; síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (síndrome VKH); degeneración macular húmeda; cicatrización de heridas; artropatía asociada a *Yersinia* y *Salmonella*.

En una realización adicional de un método de tratamiento descrito en el presente documento, la etapa de administrar al sujeto una proteína de unión o una estructura artificial de proteína de unión o un conjugado de proteína de unión descrito en el presente documento es a través de al menos un modo seleccionado entre administración parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intracelular, intracerebral, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraósea, intrapélvica, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretiniana, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, en embolada, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal y transdérmica.

La invención también permite un método de tratamiento de un paciente que padece un trastorno en el que la IL-1 es perjudicial, que comprende la etapa de administrar una proteína de unión, una estructura artificial de proteína de unión o un conjugado de proteína de unión descrito anteriormente en el presente documento, junto con o después de la administración de un segundo agente, en donde el segundo agente se selecciona a partir del grupo que consiste en esteroides inhalados; beta-agonistas; beta-agonistas de acción corta o de acción prolongada; antagonistas de leucotrienos o receptores de leucotrienos; ADVAIR; inhibidores de IgE; anticuerpos anti-IgE; XOLAIR; inhibidores de fosfodiesterasa; inhibidores de PDE4; xantinas; fármacos anticolinérgicos; agentes estabilizadores de mastocitos; cromolina; inhibidores de IL-4; inhibidores de IL-5; inhibidores de eotaxina/CCR3; antagonistas de la histamina o sus receptores, incluyendo H1, H2, H3 y H4; antagonistas de la prostaglandina D o sus receptores DP1 y CRTH2; antagonistas de TNF; un fragmento soluble de un receptor de TNF; ENBREL®; antagonistas enzimáticos de TNF; inhibidores de la enzima convertidora de TNF (TACE); antagonistas de los receptores muscarínicos; antagonistas de TGF-beta; interferón gamma; perfenidona; agentes quimioterapéuticos, metotrexato; leflunomida; sirolimús (rapamicina) o un análogo del mismo, CCI-779; inhibidores de COX2 o cPLA2; AINEs; inmunomoduladores; inhibidores de p38; inhibidores de TPL-2, MK-2 y NFkB; budesonida; factor de crecimiento epidérmico; corticosteroides; ciclosporina; sulfasalazina; aminosalicilatos; 6-mercaptopurina; azatioprina; metronidazol; inhibidores de lipoxigenasa; mesalamina; olsalazina; balsalazida; antioxidantes; inhibidores de tromboxano; antagonistas del receptor de IL-1; anticuerpos anti-IL-1β; anticuerpos anti-IL-6; factores de crecimiento; inhibidores de elastasa; compuestos de piridinil-imidazol; anticuerpos o agonistas de TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, EMAP-II, GM-CSF, FGF o PDGF; anticuerpos de CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos; FK506; rapamicina; micofenolato de mofetilo; ibuprofeno; prednisolona; inhibidores de la fosfodiesterasa; agonistas de adenosina; agentes antitrombóticos; inhibidores del complemento; agentes adrenérgicos; inhibidores de la cinasa IRAK, NIK, IKK, p38 o MAP; inhibidores de la enzima convertidora de IL-1β; inhibidores de la enzima convertidora de TNF-α; inhibidores de la señalización de linfocitos T; inhibidores de metaloproteinasas; 6-mercaptopurinas; inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; receptores de citocinas solubles; receptor de p55 TNF soluble; receptor de p75 TNF soluble; sIL-1RI; sIL-1RII; sIL-6R; citocinas antiinflamatorias; IL-4; IL-10; IL-11; y TGF-β.

Otro aspecto de la descripción proporciona al menos un anticuerpo anti-idiotipo IL-1 para al menos una proteína que se une a IL-1 descrita en el presente documento. El anticuerpo anti-idiotipo incluye cualquier molécula que contiene una proteína o un péptido que comprende al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina tal como, pero no limitadas a las mismas, al menos una CDR de una cadena pesada o ligera o una porción que se une al ligando de la misma, una región variable de la cadena pesada o la cadena ligera, una región constante de la cadena ligera o la cadena ligera, una región estructural, o cualquier porción de las mismas, que se puede incorporar en una proteína de unión de la invención.

### **Descripción detallada de la invención**

Esta invención se refiere a proteínas que se unen a IL-1β, incluyendo, pero no limitadas a, anticuerpos anti-IL-1β o

porciones de los mismos que se unen a antígeno, que se unen a IL-1 $\beta$  y proteínas de unión multivalentes, multiespecíficas tales como DVD-Ig<sup>®</sup> que se unen a IL-1 $\beta$  y a otra diana. Varios aspectos de la invención se refieren a anticuerpos y a fragmentos de anticuerpos, a proteínas de unión DVD-Ig y a composiciones farmacéuticas de las mismas, así como a ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes y células hospedadoras para la preparación de tales proteínas que se unen a IL-1 $\beta$ , incluyendo anticuerpos, proteínas de unión DVD-Ig y fragmentos de las mismas. Los métodos para uso de las proteínas que se unen a IL-1 $\beta$  de la invención para detectar IL-1 $\beta$  humana; inhibir IL-1 $\beta$  humana, ya sea *in vitro* o *in vivo*; y para regular la expresión génica, se describen también.

La invención también abarca cualquier proteína de unión o anticuerpo capaz de competir con una proteína que se une a IL-1 $\beta$  descrita en este documento.

A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos normales en la técnica. El significado y el alcance de los términos deben ser claros, sin embargo, en el caso de cualquier ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en el presente documento tienen prioridad sobre cualquier definición de diccionario o extrínseca. Además, a menos que se requiera de otra manera por el contexto, los términos singulares incluirán los plurales y los términos en plural incluirán el singular. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso de la expresión "que incluye", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitativo. Además, términos tales como "elemento" o "componente" abarcan tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

En general, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química e hibridación de proteínas y de ácidos nucleicos, descritas en este documento, son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Los métodos y las técnicas de la presente invención se llevan a cabo generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y tal y como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y explican a lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan según las indicaciones del fabricante, como se ejecutan comúnmente en la técnica o como se describen en el presente documento. Las nomenclaturas utilizadas en relación con y los procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en el presente documento, son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Se utilizan técnicas convencionales para las síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración y tratamiento de pacientes.

Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, se definen a continuación unos términos seleccionados.

El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. Los términos "péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable con el término polipéptido y también se refieren a una cadena polimérica de aminoácidos. El término "polipéptido" incluye proteínas naturales o artificiales, fragmentos de proteínas y análogos polipeptídicos de una secuencia de proteína. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico. El término "polipéptido" incluye fragmentos y variantes (incluyendo fragmentos de variantes) de los mismos, a menos que se contradiga de otro modo en el contexto. Para un polipéptido antigénico, un fragmento de polipéptido contiene opcionalmente al menos un epítipo contiguo o no lineal de polipéptido. Los límites precisos de al menos un fragmento de epítipo pueden confirmarse utilizando conocimientos ordinarios en la técnica. El fragmento comprende al menos aproximadamente 5 aminoácidos contiguos, tal como al menos aproximadamente 10 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 15 aminoácidos contiguos o al menos aproximadamente 20 aminoácidos contiguos. Una variante de polipéptido es tal y como se describe en el presente documento.

La expresión "proteína aislada" o "polipéptido aislado" es una proteína o un polipéptido que, en virtud de su origen o fuente de obtención, no está asociado con componentes asociados de forma natural que lo acompañan en su estado natural; está sustancialmente exento de otras proteínas de la misma especie; se expresa a través de una célula de una especie diferente; o que no se produce en la naturaleza. Por lo tanto, un polipéptido que se sintetiza químicamente o que se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula a partir de la cual se origina naturalmente, estará "aislado" de sus componentes asociados de forma natural. Una proteína también se puede volver sustancialmente exenta de componentes asociados de forma natural mediante aislamiento, usando métodos de purificación de proteínas bien conocidos en la técnica.

El término "recuperación" se refiere al procedimiento para hacer que una especie química tal como un polipéptido, esté sustancialmente exento de componentes asociados de forma natural, mediante aislamiento, por ejemplo, usando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la técnica.

La expresión "IL-1 $\alpha$  humana" (abreviada en este documento como hIL-1 $\alpha$  o IL-1 $\alpha$ ), incluye una citocina pleiotrópica que participa en diversas respuestas inmunes, procesos inflamatorios y hematopoyesis. Por ejemplo, IL-1 $\alpha$  incluye la citocina humana producida por macrófagos activados; estimula la proliferación de timocitos mediante la inducción de la liberación de IL-2, la maduración y la proliferación de linfocitos B y la actividad del factor de crecimiento de

fibroblastos. La expresión IL-1 $\alpha$  humana se entiende que incluye la IL-1 $\alpha$  humana recombinante (rh IL-1 $\alpha$ ) que se puede preparar por métodos convencionales de expresión recombinante.

5 La expresión "IL-1 $\beta$  humana" (abreviada en este documento como hIL-1 $\beta$ , o IL-1 $\beta$ ) incluye una citocina pleiotrópica que participa en diversas respuestas inmunes, procesos inflamatorios y hematopoyesis. La expresión IL-1 $\beta$  humana incluye IL-1 $\beta$  humana recombinante (rh IL-1 $\beta$ ) que se puede preparar por métodos convencionales de expresión recombinante.

Las secuencias de aminoácidos de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  humana se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Secuencia de IL-1 $\alpha$  humana e IL-1 $\beta$  humana**

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia
		123456789012345678901234567890
<b>IL-1<math>\alpha</math> humana madura</b>	SEQ ID NO:1	SAPFSFLSNVKYNFMRIIKYEFILNDALNQ SIIRANDQYLTAALHNLDEAVKFDMGAYK SSKDDAKITVILRISKTLQYVTAQDEDQPV LLKEMPEIPKTIITGSETNLLFFWETHGTKN YFTSVAHPNLFIAATKQDYWVCLAGGPPSIT DFQILENQA
<b>IL-1<math>\beta</math> humana madura</b>	SEQ ID NO:2	APVRSLNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALH LQGQDMEQQVVFMSFVQGEESNDKIPVAL GLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNY PKKKMEKRFVFNKIEINNKLFEESAQFPNW YISTSQAENMPVFLGGTKGGQDITDFTMQF VSS

10 La expresión "actividad biológica" se refiere a todas las propiedades biológicas inherentes de la citocina IL-1, por ejemplo, IL-1 $\alpha$  y/o IL-1 $\beta$ . Las propiedades biológicas de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  incluyen, pero no se limitan a, la unión a un receptor de IL-1.

15 Las expresiones "unión específica" o "se unen específicamente", en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, significan que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico o un epítipo) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica en lugar de a las proteínas en general. Si un anticuerpo es específico del epítipo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítipo A (o A libre, sin marcar), en una reacción que contiene "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

20 El término "anticuerpo" se refiere ampliamente a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), o cualquier fragmento, mutante, variante o derivación funcional de las mismas, que conserva las características esenciales de una molécula de Ig para unirse a un epítipo. Tales formatos mutantes, variantes o derivados de anticuerpo son conocidos en la técnica. Cuyas realizaciones no limitantes se describen a continuación.

25 En un anticuerpo de longitud completa, cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada en este documento como HCVR o VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada se compone de tres dominios: CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera (abreviada en este documento como LCVR o VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio, CL.

30 Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas desde el extremo amino-terminal al extremo carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

35

La expresión "región Fc" se utiliza para definir la región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, que se puede generar mediante la digestión con papaína de un anticuerpo intacto. La región Fc puede ser una región Fc de secuencia natural o una región Fc variante. La región Fc de una inmunoglobulina comprende generalmente dos dominios constantes, un dominio CH2 y un dominio CH3 y opcionalmente comprende un dominio CH4. Las sustituciones de residuos de aminoácidos en la porción Fc para alterar la función efectora del anticuerpo son conocidas en la técnica (Winter et al., documentos de Patente de EE.UU. nº 5.648.260 y 5.624.821). La porción Fc de un anticuerpo media en varias funciones efectoras importantes, por ejemplo, inducción de citocinas, ADCC, fagocitosis, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la semivida/tasa de aclaramiento del anticuerpo y de complejos antígeno-anticuerpo. En algunos casos, estas funciones efectoras son deseables para un anticuerpo terapéutico, pero en otros casos podrían ser innecesarias o incluso perjudiciales, dependiendo de los objetivos terapéuticos. Ciertos isotipos de IgG humana, particularmente IgG1 e IgG3, median en ADCC y CDC a través de la unión a FcγRs y el complemento C1q, respectivamente. Los receptores de Fc neonatal (FcRn) son los componentes decisivos que determinan la semivida circulante de los anticuerpos. En todavía otra realización, al menos un residuo de aminoácido se sustituye en la región constante del anticuerpo, por ejemplo, la región Fc del anticuerpo, de manera que se alteran las funciones efectoras del anticuerpo. La dimerización de dos cadenas pesadas idénticas de una inmunoglobulina está mediada por la dimerización de dominios CH3 y se estabiliza por los enlaces disulfuro dentro de la región bisagra (Huber et al., *Nature*, 264: 415-420 (1976); Thies et al., *J. Mol. Biol.*, 293: 67-79 (1999)). La mutación de residuos de cisteína dentro de las regiones bisagra para evitar los enlaces disulfuro entre la cadena pesada y la cadena pesada, desestabilizará la dimerización de los dominios CH3. Se han identificado residuos responsables de la dimerización de CH3 (Dall'Acqua et al., *Biochemistry*, 37: 9266-9273 (1998)). Por lo tanto, es posible generar media Ig monovalente. Curiosamente, estas moléculas de media de Ig monovalente se han encontrado en la naturaleza para ambas subclases de IgG e IgA (Seligmann et al., *Ann. Immunol.*, 129 C: 855-870 (1978); Biewenga et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 51: 395-400 (1983)). La estequiometría de FcRn:región Fc de Ig ha sido determinada para que sea 2:1 (West et al., *Biochemistry*, 39: 9698-9708 (2000)) y media Fc es suficiente para mediar en la unión a FcRn (Kim et al., *Eur. J. Immunol.*, 24: 542-548 (1994)). Las mutaciones para interrumpir la dimerización del dominio CH3 pueden no tener un efecto adverso mayor sobre su unión a FcRn, ya que los residuos importantes para la dimerización de CH3 se encuentran en la interfaz interna de la estructura de lámina b de CH3, mientras que la región responsable de la unión a FcRn se encuentra en la interfaz externa de los dominios CH2-CH3. Sin embargo, la molécula de media Ig puede tener cierta ventaja en la penetración tisular, debido a su tamaño que es más pequeño que el de un anticuerpo regular. En una realización, al menos un residuo de aminoácido se sustituye en la región constante de la proteína de unión de la invención, por ejemplo, la región Fc, de manera que la dimerización de las cadenas pesadas se interrumpe, lo que da como resultado moléculas de media DVD Ig. La actividad antiinflamatoria de IgG es completamente dependiente de la sialilación del glicano ligados a N del fragmento Fc de IgG. Los requisitos precisos del glicano para una actividad antiinflamatoria se han determinado, de manera que se puede crear un fragmento Fc de IgG1 adecuado, generando de este modo un Fc de IgG1 sializado, totalmente recombinante, con una potencia mucho mayor (Anthony et al., *Science*, 320:373-376 (2008)).

La expresión "porción que se une a antígeno" de un anticuerpo, se refiere a uno o varios fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad para unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, hIL-1β). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Tales realizaciones del anticuerpo también pueden ser formatos biespecíficos, específicos dobles o multiespecíficos; uniéndose específicamente a dos o más antígenos diferentes (por ejemplo, hIL-1β y una molécula de antígeno diferente, tal como hIL-1β y hIL-1α). Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro de la expresión "porción que se une a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, 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 et al., *Nature*, 341: 544-546 (1989); documento de Publicación PCT nº WO 90/05144), que comprende un único dominio variable; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes distintos, se pueden unir usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite estar formados como una sola cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al., *Science*, 242: 423-426 (1988); y Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-5883 (1988)). Tales anticuerpos de cadena sencilla se entiende que están incluidos dentro de la expresión "porción que se une a antígeno" de un anticuerpo. Otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tales como diacuerpos, también están incluidas. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una única cadena polipeptídica, pero usando un enlazador que es demasiado corto para permitir un emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de este modo a que los dominios se emparejen con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993); Poljak, R.J., *Structure*, 2: 1121-1123 (1994)). Tales porciones que se unen a anticuerpo son conocidas en la técnica (Kontermann y Dübel compiladores, *Antibody Engineering* (Springer-Verlag, New York, 2001), p. 790 (ISBN 3-540-41354-5)). Además, los anticuerpos de cadena sencilla también incluyen "anticuerpos lineales" que comprenden una pareja de segmentos Fv en tándem (VH-CH1-VH-CH1) los cuales, junto con polipéptidos de cadena ligera complementaria, forman una pareja de regiones que se unen a antígeno (Zapata et al., *Protein Eng.*, 8(10): 1057-1062 (1995); y documento de patente de EE.UU. nº 5.641.870)).

Un dominio constante de inmunoglobulina (C) se refiere a un dominio constante de la cadena pesada (CH) o ligera (CL). Las secuencias de aminoácidos del dominio constante de la cadena pesada y la cadena ligera de IgG murina y humana, son conocidas en la técnica.

5 La expresión "estructura artificial proteica que se une a IL-1 $\beta$ " (o "estructura artificial de proteína de unión") se refiere a un polipéptido que comprende una o varias de las porciones que se unen a antígeno de la invención, ligadas a un enlazador o a un dominio constante de inmunoglobulina. Un "polipéptido enlazador" comprende dos o más residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y se utilizan para enlazar una o varias porciones que se unen a antígeno. Tales polipéptidos enlazadores son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993); Poljak, R.J., Structure, 2: 1121-1123 (1994)).  
 10 Un dominio constante de inmunoglobulina se refiere a un dominio constante de la cadena pesada o ligera. Las secuencias de aminoácidos del dominio constante de la cadena pesada y la cadena ligera de IgG humana son conocidas en la técnica y están representadas en la Tabla 2.

**Tabla 2. Secuencia del dominio constante de la cadena pesada y del dominio constante de la cadena ligera de IgG humana**

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia
		123456789012345678901234567890
<b>Región constante de Ig gamma-1</b>	SEQ ID NO:3	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTEFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDITLMI $\delta$ RTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
<b>Mutante de la región constante de Ig gamma-1</b>	SEQ ID NO:4	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTEFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDITLMI $\delta$ RTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
<b>Región constante de Ig Kappa</b>	SEQ ID NO:5	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSLSLTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
<b>Región constante de Ig Lambda</b>	SEQ ID NO:6	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia

Aún más, una proteína que se une a IL-1 $\beta$ , tal como un anticuerpo o una porción del mismo que se une a antígeno, puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión más grande, formada por una asociación covalente o no covalente del anticuerpo o de la porción que se une a antígeno con una o varias otras proteínas o péptidos. Ejemplos de tales moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región del núcleo de estreptavidina para formar una molécula scFv tetramérica (Kipriyanov et al., Human Antibod. Hybridomas, 6: 93-101 (1995)) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y un marcador de polihistidina C-terminal para formar moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov et al., Mol. Immunol., 31: 1047-1058 (1994)). Porciones de anticuerpo, tales como los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub>, se pueden preparar a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales como la digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Además, los anticuerpos, las porciones de los mismos que se unen a antígeno y las moléculas de inmunoadhesión se pueden obtener usando técnicas convencionales de ADN recombinante.

Un "anticuerpo aislado" se entiende que se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente exento de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a hIL-1 $\beta$  está sustancialmente exento de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de hIL-1 $\beta$ ). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a hIL-1 $\beta$ , sin embargo, puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de IL-1 $\beta$  de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente exento de otro material celular y/o productos químicos.

La expresión "anticuerpo monoclonal" o "AcMo" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto debido a posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único antígeno. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada AcMo está dirigido contra un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" no debe interpretarse como que se debe construir requiriendo la producción del anticuerpo mediante cualquier método particular.

La expresión "anticuerpo humano" incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes obtenidas a partir de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDRs y en particular en CDR3. Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano" no incluye anticuerpos en los que las secuencias de CDRs obtenidas a partir de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado sobre secuencias de la región estructural humana.

La expresión "anticuerpo humano recombinante" incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora (descrito adicionalmente en la Sección II C, más abajo), anticuerpos aislados a partir de un banco de anticuerpos humanos, recombinante, combinatorio (Hoogenboom, H.R., Trends Biotechnol., 15: 62-70 (1997); Azzazy y Highsmith, Clin. Biochem., 35: 425-445 (2002); Gavilondo y Larrick, BioTechniques, 29: 128-145 (2000); Hoogenboom y Chames, Immunol. Today, 21: 371-378 (2000)), anticuerpos aislados a partir de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para los genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor et al., Nucl. Acids Res., 20: 6287-6295 (1992); Kellermann y Green, Curr. Opin. Biotechnol., 13: 593-597 (2002); Little et al., Immunol. Today, 21: 364-370 (2000)); o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique un corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes obtenidas a partir de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes son sometidos a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes, son secuencias que, aunque se han obtenido y están relacionadas con secuencias de VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de una especie y secuencias de la región constante de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de la cadena pesada y ligera de murino ligadas a regiones constantes humanas.

La expresión "anticuerpo injertado con CDR" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de una especie, pero en donde las secuencias de una o varias de las regiones CDRs de VH y/o VL se sustituyen por secuencias de CDRs de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de la cadena pesada y ligera de murino en donde una o varias de las CDRs murinas (por ejemplo, CDR3) se han sustituido por secuencias de CDRs humanas.

El término "CDR" se refiere a la región determinante de complementariedad dentro de secuencias variables de anticuerpos. Hay tres CDRs en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, que se designan CDR1, CDR2 y CDR3, para cada una de las regiones variables. La expresión "conjunto de CDRs" como se usa en esta memoria, se refiere a un grupo de tres CDRs que se producen en una sola región variable, capaz de unirse al antígeno. Los límites exactos de estas CDRs se han definido de manera diferente según distintos sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (1987) y (1991)) no solo proporciona un sistema de numeración de residuos inequívoco, aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también proporciona límites de residuos precisos que definen las tres CDRs. A estas CDRs se puede hacer referencia como CDRs de Kabat. Chothia y colaboradores (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987); y Chothia et al., *Nature*, 342: 877-883 (1989)) encontraron que ciertas subporciones dentro de las CDRs de Kabat adoptan conformaciones del esqueleto peptídico casi idénticas, a pesar de tener una gran diversidad a nivel de secuencia de aminoácidos. Estas subporciones se designaron L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3, en donde la "L" y la "H" designan las regiones de la cadena ligera y de la cadena pesada, respectivamente. A estas regiones se puede hacer referencia como CDRs de Chothia, que tienen límites que se superponen con las CDRs de Kabat. Otros límites que definen el solapamiento de las CDRs con las CDRs de Kabat, han sido descritos por Padlan et al. (*FASEB J.*, 9: 133-139 (1995)) y MacCallum et al. (*J. Mol. Biol.*, 262(5): 732-745 (1996)). Aún otras definiciones de límites de CDRs puede que no sigan estrictamente uno de los sistemas anteriores pero, no obstante, se solapan con las CDRs de Kabat, aunque se pueden acortar o alargar según la predicción o los hallazgos experimentales de residuos particulares o grupos de residuos, o incluso CDRs enteras no afectan significativamente a la unión al antígeno. Los métodos utilizados en el presente documento pueden utilizar CDRs definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque las realizaciones ejemplares utilizan CDRs definidas por Kabat o Chothia.

Las expresiones "numeración de Kabat", "definiciones de Kabat" y "marcación de Kabat" se usan indistintamente en el presente documento. Estos términos, que son reconocidos en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de residuos de aminoácidos que son más variable (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácidos en las regiones variables de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una porción del mismo que se une a un antígeno ((Kabat et al., *Ann. NY Acad. Sci.*, 190: 382-391 (1971); y Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication n° 91-3242 (1991)). Para la región variable de la cadena pesada, la región hipervariable se extiende desde las posiciones de aminoácidos 31 a 35 para CDR1, las posiciones de aminoácidos 50 a 65 para CDR2 y las posiciones de aminoácidos 95 a 102 para CDR3. Para la región variable de la cadena ligera, la región hipervariable se extiende desde las posiciones de aminoácidos 24 a 34 para CDR1, las posiciones de aminoácidos 50 a 56 para CDR2 y las posiciones de aminoácidos 89 a 97 para CDR3.

El crecimiento y el análisis de amplias bases de datos públicas de secuencias de aminoácidos de las regiones variables pesadas y ligeras durante los últimos veinte años, han conducido a la comprensión de los límites típicos entre las regiones estructurales (FR) y las secuencias de CDRs dentro de secuencias de la región variable y han permitido que personas expertas en esta técnica determinen con precisión las CDRs de acuerdo con la numeración de Kabat, la numeración de Chothia u otros sistemas. Véase, por ejemplo, Martin, "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains", capítulo 31, *En Antibody Engineering*, (Kontermann y Dübel, compiladores) (Springer-Verlag, Berlin, 2001), especialmente las páginas 432-433. A continuación se proporciona un método útil para la determinación de secuencias de aminoácidos de CDRs de Kabat dentro de las secuencias de aminoácidos de las regiones pesadas variables (VH) y ligeras variables (VL):

Para identificar una secuencia de aminoácidos de CDR-L1:

Se inicia aproximadamente a 24 residuos de aminoácidos desde el extremo amino terminal de la región VL;

El residuo antes de la secuencia de CDR-L1 es siempre cisteína (C);

El residuo después de la secuencia de CDR-L1 es siempre un residuo de triptófano (W), normalmente Trp-Tyr-Gln (W-Y-Q), pero también Trp-Leu-Gln (W-L-Q), Trp-Phe-Gln (W-F-Q) y Trp-Tyr Leu (W-Y-L);

La longitud es normalmente de 10 a 17 residuos de aminoácidos.

Para identificar una secuencia de aminoácidos de CDR-L2:

Se inicia siempre 16 residuos después del extremo de CDR-L1;

Los residuos antes de la secuencia de CDR-L2 son generalmente Ile-Tyr (I-Y), pero también Val-Tyr (V-Y), Ile-Lys (I-K) e Ile-Phe (I-F);



La longitud es siempre de 7 residuos de aminoácidos.

Para identificar una secuencia de aminoácidos de CDR-L3:

Se inicia siempre 33 aminoácidos después del extremo de CDR-L2;

El residuo antes de la secuencia de aminoácidos de CDR-L3 es siempre cisteína (C);

5 Los residuos después de la secuencia de CDR-L3 son siempre Phe-Gly-X-Gly (F-G-X-G) (SEQ ID NO: 11), en donde X es cualquier aminoácido;

La longitud es normalmente de 7 a 11 residuos de aminoácidos.

Para identificar una secuencia de aminoácidos de CDR-H1:

10 Se inicia aproximadamente a 31 residuos de aminoácidos desde el extremo amino terminal de la región VH y siempre 9 residuos después de una cisteína (C);

Los residuos antes de la secuencia de CDR-H1 son siempre Cys-X-X-X-X-X-X-X (SEQ ID NO: 12), en donde X es cualquier aminoácido;

El residuo después de la secuencia de CDR-H1 es siempre Trp (W), normalmente Trp-Val (W-V), pero también Trp-Ile (W-I) y Trp-Ala (W-A);

15 La longitud es normalmente de 5 a 7 residuos de aminoácidos.

Para identificar una secuencia de aminoácidos de CDR-H2:

Se inicia siempre 15 residuos de aminoácidos después del extremo de CDR-H1;

Los residuos antes de la secuencia de CDR-H2 son normalmente Leu-Glu-Trp-Ile-Gly (L-E-W-I-G) (SEQ ID NO: 23), pero otras variaciones también;

20 Los residuos después de la secuencia de CDR-H2 son Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala (K/R-L/I/V/F/T/A-T/S/I/A);

La longitud es normalmente de 16 a 19 residuos de aminoácidos.

Para identificar una secuencia de aminoácidos de CDR-H3:

25 Se inicia siempre 33 residuos de aminoácidos después del extremo de CDR-H2 y siempre 3 después de una cisteína (C);

Los residuos antes de la secuencia de CDR-H3 son siempre Cys-X-X (C-X-X), en donde X es cualquier aminoácido, normalmente Cys-Ala-Arg (C-A-R);

Los residuos después de la secuencia de CDR-H3 son siempre Trp-Gly-X-Gly (W-G-X-G) (SEQ ID NO: 24), en donde X es cualquier aminoácido;

30 La longitud es normalmente de 3 a 25 residuos de aminoácidos.

35 Tal como se utiliza en este documento, el término residuo "canónico" se refiere a un residuo en una CDR o una región estructural que define una estructura de CDR canónica particular, tal como está definida por Chothia et al. (J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987)); y Chothia et al. (J. Mol. Biol., 227: 799-817 (1992)). De acuerdo con Chothia et al., las porciones decisivas de las CDRs de muchos anticuerpos tienen confirmaciones de esqueleto peptídico casi idénticas, a pesar de la gran diversidad a nivel de secuencia de aminoácidos. Cada estructura canónica específica principalmente un conjunto de ángulos de torsión del esqueleto peptídico para un segmento contiguo de residuos de aminoácidos que forman un bucle.

40 Un anticuerpo "madurado por afinidad" es un anticuerpo con una o varias alteraciones en una o varias CDRs del mismo, que dan como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo hacia un antígeno diana, en comparación con un anticuerpo parental que no posee la o las alteraciones. Los anticuerpos madurados por afinidad a modo de ejemplo tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares hacia el antígeno diana. Se conoce en la técnica una variedad de procedimientos para la producción de anticuerpos madurados por afinidad. Por ejemplo, Marks et al., BioTechnology, 10: 779-783 (1992) describen la maduración por afinidad mediante intercambios al azar de dominios de VH y VL. La mutagénesis aleatoria de residuos de CDRs y/o de la región estructural está descrita por Barbas et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 91: 3809-3813 (1994); Schier et al., Gene, 169: 147-155 (1995); Yelton et al., J. Immunol., 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol., 154(7): 3310-3319 (1995); Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992). Una mutación selectiva en posiciones de mutagénesis selectiva y en posiciones de contacto o hipermutación con un residuo de aminoácido con actividad potenciadora, se describe en el documento de

Patente de EE.UU. nº 6.914.128 B1.

La expresión "proteína de unión multivalente" se refiere a una proteína de unión que comprende dos o más sitios que se unen a antígeno. Una proteína de unión multivalente está diseñada preferiblemente para tener tres o más sitios que se unen a antígeno y generalmente no es un anticuerpo de origen natural. La expresión "proteína de unión multiespecífica" se refiere a una proteína de unión capaz de unirse a dos o más dianas relacionadas o no relacionadas. Las proteínas de unión con "dominio variable doble" ("DVD") de la invención comprenden dos o más sitios que se unen a antígeno y son proteínas de unión tetravalentes o multivalentes. Las DVDs pueden ser mono-específicas, es decir, capaces de unirse a un antígeno, o multiespecíficas, es decir, capaces de unirse a dos o más antígenos. Una proteína de unión DVD que comprende dos polipéptidos DVD de cadena pesada y dos polipéptidos DVD de cadena ligera se conoce como una "inmunoglobulina DVD" o "DVD-Ig". Cada mitad de una DVD-Ig comprende un polipéptido DVD de cadena pesada y un polipéptido DVD de cadena ligera y dos o más sitios que se unen a antígeno. Cada sitio de unión comprende un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera con un total de seis CDRs implicadas en la unión a antígeno por cada sitio que se une a antígeno.

Una descripción del diseño, la expresión y la caracterización de las moléculas DVD-Ig se proporciona en los documentos de publicación de PCT nº WO 2007/024715; Patente de EE.UU. nº 7.612.181; y Wu et al., *Nature Biotechnol.*, 25: 1290-1297 (2007). Un ejemplo preferido de tales moléculas DVD-Ig comprende una cadena pesada que comprende la fórmula estructural  $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ , en donde VD1 es un primer dominio variable de la cadena pesada, VD2 es un segundo dominio variable de la cadena pesada, C es un dominio constante de la cadena pesada, X1 es un enlazador con la condición de que no sea CH1, X2 es una región Fc y n es 0 o 1, pero preferiblemente 1; y una cadena ligera que comprende la fórmula estructural  $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ , en donde VD1 es un primer dominio variable de la cadena ligera, VD2 es un segundo dominio variable de la cadena ligera, C es un dominio constante de la cadena ligera, X1 es un enlazador con la condición de que no sea CH1, X2 no comprende una región Fc y n es 0 o 1, pero preferiblemente 1. Tal DVD-Ig puede comprender dos cadenas pesadas de este tipo y dos cadenas ligeras de este tipo, en donde cada cadena comprende dominios variables ligados en tándem sin una región constante intercalada entre las regiones variables, en donde una cadena pesada y una cadena ligera se asocian para formar sitios de unión a antígeno funcionales en tándem y una pareja de cadenas pesadas y ligeras se pueden asociar con otra pareja de cadenas pesadas y ligeras para formar una proteína de unión tetramérica con cuatro sitios funcionales de unión a antígeno. En otro ejemplo, una molécula DVD-Ig puede comprender cadenas pesadas y ligeras comprendiendo cada una tres dominios variables (VD1, VD2, VD3) ligados en tándem sin una región constante intercalada entre los dominios variables, en donde una pareja de cadenas pesadas y ligeras se puede asociar para formar tres sitios de unión a antígeno y en donde una pareja de cadenas pesadas y ligeras se puede asociar con otra pareja de cadenas pesadas y ligeras para formar una proteína de unión tetramérica con seis sitios de unión a antígeno.

Una proteína de unión DVD-Ig se puede unir a uno o varios epítomos de IL-1 $\beta$ . Una proteína de unión DVD-Ig también se puede unir a un epítomo de IL-1 $\beta$  y a un epítomo de un segundo antígeno diana, distinto de un polipéptido IL-1 $\beta$ .

La expresión "anticuerpo biespecífico", tal y como se usa en este documento, se refiere a anticuerpos de longitud completa que se generan mediante tecnología de cuadro (véase, Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537-540 (1983)), mediante una conjugación química de dos anticuerpos monoclonales diferentes (véase, Staerz et al., *Nature*, 314: 628-631 (1985)), o mediante "botón en ojal" o enfoques similares que introducen mutaciones en la región Fc (véase, Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(14): 6444-6448 (1993)), dando como resultado múltiples especies de inmunoglobulinas diferentes de las cuales solo una es el anticuerpo biespecífico funcional. Mediante una función molecular, un anticuerpo biespecífico se une a un antígeno (o epítomo) en uno de sus dos brazos de unión (una pareja de HC/LC) y se une a un antígeno diferente (o epítomo) en su segundo brazo (una pareja diferente de HC/LC). Por esta definición, un anticuerpo biespecífico tiene dos brazos de unión a antígeno diferentes (tanto en las secuencias de CDRs como en la especificidad) y es monovalente para cada antígeno al que se une.

La expresión "anticuerpo de doble especificidad", tal y como se usa en este documento, se refiere a anticuerpos de longitud completa que se pueden unir a dos antígenos diferentes (o epítomos) en cada uno de sus dos brazos de unión (una pareja de HC/LC) (véase, el documento de publicación PCT nº WO 02/02773). De acuerdo con ello, una proteína de doble unión específica tiene dos brazos idénticos de unión que se unen a antígeno, con especificidad idéntica y secuencias de CDRs idénticas y es bivalente para cada uno de los antígenos a los que se une.

Un "sitio de unión a antígeno funcional" de una proteína de unión es uno que es capaz de unirse a un antígeno diana. La afinidad de la unión al antígeno del sitio de unión a antígeno no es necesariamente tan fuerte como la del anticuerpo parental a partir del cual se obtiene el sitio de unión a antígeno, pero la capacidad de unirse a antígeno debe ser medible usando uno cualquiera entre una variedad de métodos conocidos para la evaluación de la unión de un anticuerpo a un antígeno. Por otra parte, la afinidad de la unión al antígeno de cada uno de los sitios de unión a antígeno de un anticuerpo multivalente en este documento, no tiene por qué ser cuantitativamente la misma.

El término "citocina" es un término genérico para las proteínas que son liberadas por una población celular y que actúan sobre otra población de células como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citocinas son linfocinas,

monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen hormonas de crecimiento, tales como la hormona de crecimiento humana, N-metionil hormona de crecimiento humana y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glicoproteicas, tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante del tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; un factor de necrosis tumoral como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y el factor de necrosis tumoral beta (TNF- $\beta$ ); sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a la gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento vascular endotelial; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso, tales como NGF-alfa (NGF- $\alpha$ ); factor de crecimiento plaquetario; factor de crecimiento placentario; factores de crecimiento transformante (TGFs) tales como TGF-alfa (TGF- $\alpha$ ) y TGF-beta (TGF- $\beta$ ); factor de crecimiento similar a la insulina 1 y 11; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como el interferón-alfa (IFN- $\alpha$ ), interferón-beta (IFN- $\beta$ ) e interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ); factores estimulantes de colonias (CSFs) como el CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (ILs) tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-33; y otros factores de polipéptidos que incluyen LIF y ligando kit (KL). Tal como se utiliza en este documento, el término citocina incluye proteínas procedentes de fuentes naturales o de un cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia natural.

Tal y como se emplea en el presente documento, los términos "donante" y "anticuerpo donante" se refieren a un anticuerpo que proporciona una o varias CDRs. En una realización ejemplar, el anticuerpo donante es un anticuerpo de una especie diferente a la del anticuerpo a partir del cual se obtienen o derivan las regiones estructurales. En el contexto de un anticuerpo humanizado, la expresión "anticuerpo donante" se refiere a un anticuerpo no humano que proporciona una o varias CDRs.

Tal y como se usa en este documento, la expresión "región estructural" o "secuencia de la región estructural" se refiere a las secuencias restantes de una región variable menos las CDRs. Debido a que la definición exacta de una secuencia de CDR se puede determinar por diferentes sistemas, el significado de una secuencia de la región estructural está sujeto a diferentes interpretaciones de forma correspondiente. Las seis CDRs (CDR-L1, -L2 y -L3 de la cadena ligera y CDR-H1, -H2 y -H3 de la cadena pesada) también dividen las regiones estructurales en la cadena ligera y la cadena pesada en cuatro subregiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, en donde CDR1 se coloca entre FR1 y FR2, CDR2 entre FR2 y FR3 y CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las subregiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región estructural, tal y como está indicada por otros, representa las FRs combinadas dentro de la región variable de una sola cadena de inmunoglobulina, de origen natural. Tal y como se usa en este documento, una FR representa una de las cuatro subregiones y FRs representa dos o más de las cuatro subregiones que constituyen una región estructural.

Tal y como se usa en el presente documento, los términos "aceptor" y "anticuerpo aceptor" se refieren al anticuerpo que proporciona la secuencia de ácido nucleico que codifica al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98 % o el 100% de las secuencias de aminoácidos de una o varias de las regiones estructurales. En algunas realizaciones, el término "aceptor" se refiere al anticuerpo que proporciona la secuencia de aminoácidos o ácido nucleico que codifica la o las regiones constantes. En aún otra realización, el término "aceptor" se refiere al anticuerpo que proporciona la secuencia de ácido nucleico que codifica una o varias de las regiones estructurales y la o las regiones constantes. En una realización específica, el término "aceptor" se refiere a una secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico de un anticuerpo que proporciona o codifica al menos 80%, preferiblemente, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o el 100% de las secuencias de aminoácidos de una o varias de las regiones estructurales. De acuerdo con esta realización, un aceptor puede contener al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos 10 residuos de aminoácidos que no están presentes en una o varias posiciones específicas de un anticuerpo humano. Una región estructural del aceptor y/o una o varias regiones constantes del aceptor, por ejemplo, se pueden derivar u obtener a partir de un gen de anticuerpo de la línea germinal, un gen de anticuerpo maduro, un anticuerpo funcional (por ejemplo, anticuerpos bien conocidos en la técnica, anticuerpos en desarrollo o anticuerpos disponibles comercialmente).

Las secuencias aceptoras de la cadena pesada y la cadena ligera humana se conocen en la técnica. En una realización de la invención, secuencias aceptoras de la cadena pesada y la cadena ligera humana se seleccionan a partir de las secuencias enumeradas procedentes de V-base (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) o de IMGT<sup>®</sup>, el sistema Internacional de información de ImMunogeneTics<sup>®</sup> (<http://imgt.cines.fr/textes/IMGTrepertoire/LocusGenes/>). En otra realización de la invención, las secuencias aceptoras de la cadena pesada y la cadena ligera humana se seleccionan a partir de las secuencias descritas en la Tabla 3 y la Tabla 4.

**Tabla 3. Secuencias aceptoras de la cadena pesada**

SEQ ID NO:	Región de la proteína	Secuencia
		123456789012345678901234567890
7	FR1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS

ES 2 635 594 T3

SEQ ID NO:	Región de la proteína	Secuencia
		123456789012345678901234567890
8	FR2	WVRQAPGKGLEWVA
9	FR3	RFTISRDN SKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFC AR
10	FR4	WGQGTPVTVSS
240	VH3-7 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
241	VH3-7 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
		123456789012345678901234567890
242	VH3-7 FR3	RFTISRDN AKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYC AR
243	JH4 FR4	WGQGLTVTVSS
244	VH3 CONSENSO FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
245	VH3 CONSENSO FR2	WVRQAPGKGLEWVS
246	VH3 CONSENSO FR3	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC AR
247	JH4 FR4	WGQGLTVTVSS
248	VH1-46 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT
249	VH1-46 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
250	VH1-46 FR3	RVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYC AR
251	JH4 FR4	WGQGLTVTVSS
252	VH3-30 FR1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
253	VH3-30 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
254	VH3-30 FR3	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC AR
255	JH3 FR4	WGQGMVTVSS
256	VH3 CONSENSO FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
257	VH3 CONSENSO FR2	WVRQAPGKGLEWVS
258	VH3 CONSENSO FR3	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC AR
259	JH3 FR4	WGQGMVTVSS
260	VH2-70/JH6 FR1	EVTLRSGPALVKPTQLTLTCTFSGFSL
261	VH2-70/JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLA
262	VH2-70/JH6 FR3	RLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVD TATYYC AR

ES 2 635 594 T3

SEQ ID NO:	Región de la proteína	Secuencia
		123456789012345678901234567890
263	VH2-70/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
264	VH2-26/JH6 FR1	EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSL
265	VH2-26/JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLA
266	VH2-26/JH6 FR3	RLTISKDTSKSNQVVLMTNMDPVDTAVYYC AR
267	VH2-26/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
268	VH3-72/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
269	VH3-72/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVG
270	VH3-72/JH6 FR3	RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYC AR
271	VH3-72/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
272	VH3-21/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
273	VH3-21/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
274	VH3-21/JH6 FR3	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC AR
275	VH3-21/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
276	VH1-69/JH6 FR1	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFTFS
		123456789012345678901234567890
277	VH1-69/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
278	VH1-69/JH6 FR3	RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYC AR
279	VH1-69/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
280	VH1-18/JH6 FR1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT
281	VH1-18/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
282	VH1-18/JH6 FR3	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC AR
283	VH1-18/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
284	IGHV4-59 FR1	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS
285	IGHV4-59 FR2	WIRQPPGKGLEWIG
286	IGHV4-59 FR3	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC AR
287	IGHV4-59/JH FR4	WGQGLTVTVSS
288	IGHV3-66 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGSIS
289	IGHV3-66 FR2	WIRQAPGKGLEWIG

ES 2 635 594 T3

SEQ ID NO:	Región de la proteína	Secuencia
		123456789012345678901234567890
290	IGHV3-66 FR3	RVTISVDTSKNSFYLQMNSLRAEDTAVYYC AR
291	IGHV3-66/JH FR4	WGQGTlVTVSS
292	IGHV4-59 FR1	EVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSIS
293	IGHV4-59 FR2	WIRQAPGKGLEWIG
294	IGHV4-59 FR3	RVTISVDTSKNQFYLKLSSVRAEDTAVYYC AR
295	IGHV4-59/JH FR4	WGQGTlVTVSS
296	IGHV5-51 FR1	EVQLVQSGTEVKKPGESLKISCKVSGGSIS
297	IGHV5-51 FR2	WIRQMPGKGLEWIG
298	IGHV5-51 FR3	QVTISVDTSFNITFFLQWSSLKASDTAMYYC AR
299	IGHV5-51/JH FR4	WGQGTMTVTVSS
300	IGHV2-70 FR1	EVTlRESGPALVKPTQTLTLTCTVSGGSIS
301	IGHV2-70 FR2	WIRQPPGKGLEWIG
302	IGHV2-70 FR3	RVTISVDTSKNQFVLTMTNMDPVDATYYC AR
303	IGHV2-70/JH FR4	WGQGTTVTVSS
304	IGHV3-15 FR1	EVQLLESggGLVKSGSLRLSCAASGFTFR
305	IGHV3-15 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
306	IGHV3-15 FR3	RFTISRDNskNTLYLQLNSLRAEDTAVYYC AK
307	IGHV3-15/JH FR4	WGQGTMTVTVSS
308	IGHV3-43 FR1	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFG
309	IGHV3-43 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
310	IGHV3-43 FR3	RFTISRDNskNTLYLQLNSLRAEDTAVYYC AK
311	IGHV3-43/JH FR4	WGQGTMTVTVSS
312	VH1-18/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
313	VH7-4.1/JH6 FR1	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT
314	VH7-4.1/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
		123456789012345678901234567890
315	VH7-4.1/JH6 FR3	RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYC AR

ES 2 635 594 T3

SEQ ID NO:	Región de la proteína	Secuencia
		123456789012345678901234567890
316	VH7-4.1/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS

Tabla 4. Secuencias aceptoras de la cadena ligera

SEQ ID NO:	Región de la proteína	Secuencia
		123456789012345678901234567890
13	FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC
14	FR2	WYQQTPGKAPKLLIY
15	FR3	GVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLPEDIATY YC
16	FR4	FGQGTKLQIT
25	O2 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC
317	O2 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
318	O2 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFLTFTISSLPEDFATY YC
319	JK2 FR4	FGQGTKLEIK
320	L2 FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
321	L2 FR2	WYQQKPGQAPRLLIY
322	L2 FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTFTISSLQSEDFAVY YC
323	JK2 FR4	FGQGTKLEIK
324	B3/JK4 FR1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC
325	B3/JK4 FR2	WYQQKPGQPPKLLIY
326	B3/JK4 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFLTFTISSLQAEDVAVY YC
327	B3/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
328	L2/JK4 FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
329	L2/JK4 FR2	WYQQKPGQAPRLLIY
330	L2/JK4 FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTFTISSLQSEDFAVY YC
331	L2/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
332	L15/JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC
333	L15/JK4 FR2	WYQQKPEKAPKSLIY
334	L15/JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFLTFTISSLPEDFATY YC

ES 2 635 594 T3

SEQ ID NO:	Región de la proteína	Secuencia
335	L15/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
336	L5/JK4 FR1	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITC
337	L5/JK4 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
338	L5/JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATY YC
339	L5/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
340	IGLV3-1 FR1	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC
341	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
		123456789012345678901234567890
342	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADY YC
343	IGLV3-1/JL FR4	FGYGTKVTVL
344	IGLV3-1 FR1	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC
345	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
346	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADY YC
347	IGLV3-1/JL FR4	GGGKLTVLG
348	IGLV3-1 FR1	YELTQPPSVSVSPGQTASITC
349	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
350	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADY YC
351	IGLV3-1/JL FR4	GGGKLTVLG
352	IGLV3-1 FR1	LYVLTQPPSVSVSPGQTASITC
353	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
354	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQTMDEADY LC
355	IGLV3-1/JL FR4	FGGGTKVTVLG
356	IGKV6D-21 FR1	EYVLTQSPDFQSVTPKEKVTITC
357	IGKV6D-21 FR2	WYQQKPDQSPKLVIIY
358	IGKV6D-21 FR3	GVPSRFSGSNSGDDATLTINSLEAEDAATY YC
359	IGKV6D-21/JK FR4	FGGGTKVEIKR
360	IGKV3D-15 FR1	EYVLTQSPATLSVSPGERATLSC
361	IGKV3D-15 FR2	WYQQKPGQSPRLVIY
362	IGKV3D-15 FR3	



SEQ ID NO:	Región de la proteína	Secuencia
		DIPARFSGSNSGDEATLTISSLQSEDFAVY YC
363	IGKV3D-15/JK FR4	FGQGTRLEIKR
364	IGKV4-1 FR1	DYVLTQSPDSLAVSLGERATINC
365	IGKV4-1 FR2	WYQQKPGQSPKLVIIY
366	IGKV4-1 FR3	GIPDRFSGSNSGDDAATLTISSLQAEDVAVY YC
367	IGKV4-1/JK FR4	FGGGTKVEIKR
368	IGLV3-1 FR1	LPVLTQPPSVSVSPGQTASITC
369	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
370	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGNTATLTIISGTQTMDEADY LC
371	IGLV3-1/JL FR4	FGGGTKVTVL
372	IGLV3-1 FR1	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC
373	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
374	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGNTATLTIISGTQTMDEADY LC
375	IGLV3-1/JL FR4	FGGGTKLTVL
376	1-33/018/JK2 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC
377	1-33/018/JK2 FR2	WYQQKPGKAPKLLIIY
378	1-33/018/JK2 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATY YC
		<b>123456789012345678901234567890</b>
379	1-33/018/JK2 FR4	FGQGTKLEIKR
380	1-33/018/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR

5 Tal como se utiliza en este documento, la expresión "gen de un anticuerpo de la línea germinal" o "fragmento génico" se refiere a una secuencia de inmunoglobulina codificada por células no linfoides que no han experimentado el proceso de maduración que conduce a una reorganización genética y mutación para la expresión de una inmunoglobulina particular. (Véase, por ejemplo, Shapiro et al., Crit. Rev. Immunol., 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis et al., Adv. Exp. Med. Biol., 484: 13-30 (2001)). Una de las ventajas proporcionadas por diversas realizaciones de la presente invención parte del reconocimiento de que los genes de anticuerpos de la línea germinal son más propensos que los genes de anticuerpos maduros a conservar estructuras de secuencias de aminoácidos esenciales, características de individuos en las especies, por lo tanto, tienen menos probabilidades de ser reconocidos como procedentes de una fuente ajena cuando se usan terapéuticamente en esa especie.

10 Tal como se utiliza en este documento, el término residuos "clave" se refiere a ciertos residuos dentro de la región variable que tienen un mayor impacto sobre la especificidad y/o la afinidad de la unión de un anticuerpo, en particular un anticuerpo humanizado. Un residuo clave incluye, pero no se limita a, uno o varios de los siguientes: un residuo que es adyacente a una CDR, un sitio de glicosilación potencial (puede ser o bien un sitio de N-glicosilación u O-glicosilación), un residuo raro, un residuo capaz de interactuar con el antígeno, un residuo capaz de interactuar con una CDR, un residuo canónico, un residuo de contacto entre una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, un residuo dentro de la zona de Vernier y un residuo en la región

que se solapa entre la definición de Chothia de una CDR1 de la cadena pesada variable y la definición de Kabat de la primera región estructural de la cadena pesada.

La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera procedentes de una especie no humana (por ejemplo, un ratón) pero en los que al menos una porción de la secuencia de VH y/o VL ha sido alterada para ser más "similar a la humana", es decir, más similar a secuencias variables de la línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo injertado con una CDR, en el que se introducen secuencias de CDRs humanas en secuencias de VH y VL no humanas para reemplazar las secuencias correspondientes de CDRs no humanas. También "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo o una variante, derivado, análogo o fragmento del mismo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de interés y que comprende una región estructural (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y una región determinante de la complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. Tal como se utiliza en este documento, el término "sustancialmente" en el contexto de una CDR, se refiere a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una CDR de un anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de al menos uno y normalmente dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, FabC, Fv) en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDRs se corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, un anticuerpo donante) y todas o sustancialmente todas las regiones estructurales son las de una secuencia de consenso de una inmunoglobulina humana. En una realización, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de una inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene tanto la cadena ligera, así como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado solo contiene una cadena ligera humanizada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado solo contiene una cadena pesada humanizada. En realizaciones específicas, un anticuerpo humanizado solo contiene un dominio variable humanizado de una cadena ligera y/o de una cadena pesada humanizada.

Un anticuerpo humanizado puede seleccionarse a partir de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE y cualquier isotipo, incluyendo, sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo y se pueden seleccionar dominios constantes particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas usando métodos bien conocidos en la técnica.

Las regiones estructurales y CDRs de un anticuerpo humanizado no tienen que corresponderse exactamente con las secuencias parentales, por ejemplo, la CDR del anticuerpo donante o la región estructural de consenso se pueden mutagenizar mediante sustitución, inserción y/o delección de al menos un residuo de aminoácido, por lo que el residuo de la CDR o estructural en ese sitio no se corresponde con el anticuerpo donante o la región estructural de consenso. En una realización ejemplar, tales mutaciones, sin embargo, no serán extensas. Por lo general, al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90% y lo más preferiblemente al menos 95% de los residuos del anticuerpo humanizado se corresponden con los de las secuencias de FR y CDR parentales. Tal como se utiliza en este documento, la expresión "región estructural de consenso" se refiere a la región estructural en la secuencia de consenso de la inmunoglobulina. Tal como se utiliza en este documento, la expresión "secuencia de inmunoglobulina de consenso" se refiere a la secuencia formada a partir de los aminoácidos que están presentes más frecuentemente (o nucleótidos) en una familia de secuencias de inmunoglobulina relacionadas (véase, por ejemplo, Winnaker, From Genes a Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania 1987)). En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia de consenso está ocupada por el aminoácido presente con más frecuencia en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos están presentes con igual frecuencia, ambos se pueden incluir en la secuencia de consenso.

Con respecto a la construcción de una DVD-Ig u otras moléculas de proteína de unión, un "enlazador" se utiliza para indicar un único aminoácido o un polipéptido ("polipéptido enlazador") que comprende dos o más residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y usados para enlazar una o varias porciones que se unen a antígeno. Tales polipéptidos enlazadores son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993); Poljak, R.J., Structure, 2: 1121-1123 (1994)). Enlazadores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, GGGGSG (SEQ ID NO:26), GGS GG (SEQ ID NO:27), GGGSGGGGS (SEQ ID NO:28), GGS GGGGS (SEQ ID NO:223), GGS GGGGS GS (SEQ ID NO:29), GGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO:30), GGGSGGGGS GGGGS (SEQ ID NO:31), GGGSGGGGS GGGGS (SEQ ID NO:32), ASTKGP (SEQ ID NO:33), ASTKGPSVFLAP (SEQ ID NO:34), TVAAP (SEQ ID NO:35), RTVAAP (SEQ ID NO:224), TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO:36), RTVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO:225), AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO:37), AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO:38), AKTTPKLG (SEQ ID NO:39), SAKTTPKLG (SEQ ID NO:40), SAKTTP (SEQ ID NO:41), RADAAP (SEQ ID NO:42), RADAAPT VS (SEQ ID NO:43), RAAAAAGGPGS (SEQ ID NO:44), RAAAAAGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:45), SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO:46), ADAAP (SEQ ID NO:47), ADAAPT VSIFPP (SEQ ID NO:48), QPKAAP (SEQ ID NO:49), QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO:50), AKTTP (SEQ ID NO:51), AKTTPSVTLAP (SEQ ID NO:52), AKTTAP (SEQ ID NO:53), AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO:54), GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO:55), GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO:56) y GHEAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO:57).

Tal y como se usa en este documento, la zona de "Vernier" se refiere a un subconjunto de residuos estructurales que pueden acomodar una estructura de CDR y poner a punto el ajuste con un antígeno como se describe en Foote y Winter, J. Mol. Biol., 224: 487-499 (1992), que se incorpora en este documento como referencia). Los residuos de la zona de Vernier forman una capa subyacente a las CDRs y pueden tener un efecto sobre la estructura de las CDRs y la afinidad del anticuerpo.

Tal como se utiliza en este documento, el término "neutralizante" se refiere a la neutralización de la actividad biológica de un antígeno (por ejemplo, la citocina IL-1 $\beta$ ) cuando una proteína de unión se une específicamente al antígeno. Preferiblemente, una proteína de unión neutralizante descrita en el presente documento se une a hIL-1 $\beta$ , dando como resultado la inhibición de una actividad biológica de hIL-1 $\beta$ . Preferiblemente, la proteína de unión neutralizante se une a hIL-1 $\beta$  y reduce una actividad biológica de hIL-1 $\beta$  en al menos aproximadamente un 20%, 40%, 60%, 80%, 85% o más. La inhibición de una actividad biológica de hIL-1 $\beta$  a través de una proteína de unión neutralizante puede evaluarse midiendo uno o varios indicadores de la actividad biológica de hIL-1 $\beta$ , bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la inhibición de la secreción de IL-6 humana mediante la inducción de IL-1 $\beta$  en las células HS27.

El término "actividad" incluye actividades tales como la especificidad/afinidad de la unión de un anticuerpo hacia un antígeno, por ejemplo, un anticuerpo anti-hIL-1 $\beta$  que se une a un antígeno de IL-1 $\beta$  y/o la potencia neutralizante de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-1 $\beta$  cuya unión a hIL-1 $\beta$  inhibe la actividad biológica de hIL-1 $\beta$ , por ejemplo, la inhibición de la secreción de IL-6 humana mediante la inducción de IL-1 $\beta$  en las células HS27.

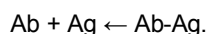
El término "epítipo" incluye cualquier determinante polipeptídico capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o un receptor de linfocitos T. En ciertas realizaciones, los determinantes de epítopos incluyen agrupaciones de superficies químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, fosforilo o sulfonilo y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que se une a un anticuerpo. En ciertas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce preferencialmente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. Los anticuerpos se dice que "se unen al mismo epítipo" si los anticuerpos compiten de forma cruzada (uno evita la unión o el efecto modulador del otro). Además, las definiciones estructurales de epítopos (solapantes, similares, idénticos) son informativas, pero las definiciones funcionales son frecuentemente más relevantes, ya que abarcan parámetros estructurales (unión) y funcionales (modulación, competencia).

La expresión "resonancia de plasmón superficial", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real, mediante la detección de alteraciones en concentraciones de proteína dentro de una matriz biosensora, por ejemplo, usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, New Jersey). Para descripciones adicionales, véanse, Jönsson et al., Ann. Biol. Clin., 51: 19-26 (1993); Jönsson et al., BioTechniques, 11: 620-627 (1991); Johnsson et al., J. Mol. Recognt., 8: 125-131 (1995); y Johnsson et al., Anal. Biochem., 198: 268-277 (1991).

El término " $K_{on}$ " (también "Kon", "kon"), tal y como se usa en el presente documento, se entiende que se refiere a la constante de la tasa de asociación para la asociación de una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo) con un antígeno para formar un complejo de asociación, por ejemplo, un complejo de anticuerpo/antígeno, como es conocido en la técnica. La " $K_{on}$ " también se conoce por los términos de "constante de la tasa de asociación", o " $k_a$ ", como se usa indistintamente en este documento. Este valor indica la tasa de unión de un anticuerpo con su antígeno diana o la tasa de formación de complejo entre un anticuerpo y un antígeno como se muestra por la ecuación a continuación:



El término " $K_{off}$ " (también "Koff", "koff"), tal y como se usa en el presente documento, se entiende que se refiere a la constante de la tasa de disociación para la disociación, o "constante de la tasa de disociación", de una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo) desde un complejo de asociación (por ejemplo, un complejo de antígeno/anticuerpo) como se conoce en la técnica. Este valor indica la tasa de disociación de un anticuerpo de su antígeno diana o la separación de un complejo Ab-Ag a lo largo del tiempo en anticuerpo libre y antígeno como se muestra por la siguiente ecuación:



El término " $K_D$ " (también " $K_d$ "), tal y como se usa en el presente documento, se entiende que se refiere a la "constante de disociación en equilibrio" y se refiere al valor obtenido en una medición de la titulación en equilibrio, o dividiendo la constante de la tasa de disociación (Koff) por la constante de la tasa de asociación (Kon). La constante de la tasa de asociación (Kon), la constante de la tasa de disociación (Koff) y la constante de disociación en equilibrio ( $K$  se utiliza para representar la afinidad de la unión de un anticuerpo con un antígeno. Los métodos para determinar las constantes de la tasa de asociación y disociación son bien conocidos en la técnica. El uso de técnicas basadas en fluorescencia ofrece una sensibilidad elevada y la capacidad de examinar muestras en tampones fisiológicos en equilibrio. Otros enfoques experimentales e instrumentos tales como un ensayo BIAcore® (análisis de

la interacción biomolecular) se pueden utilizar (por ejemplo, un instrumento disponible en BIAcore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Suecia). Además, un ensayo KinExA® (Ensayo de Exclusión Cinética), disponible en Sapidyne Instruments (Boise, Idaho) también se puede utilizar.

5 Los términos "marcador" y "marcador detectable" significan un resto fijado a un ligando específico, tal como un anticuerpo o un analito, por ejemplo, para hacer que la reacción entre los miembros de una pareja de ligandos específicos, tal como un anticuerpo y un analito, sea detectable. Al ligando específico, por ejemplo, un anticuerpo o analito, marcado de este modo se hace referencia como "marcado de manera detectable". Por lo tanto, la expresión "proteína de unión marcada", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína con un marcador incorporado que proporciona la identificación de la proteína de unión. En una realización, el marcador es un marcador detectable que puede producir una señal que es detectable por medios visuales o instrumentales, por ejemplo, mediante la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la fijación a un polipéptido de restos de biotínulo que se pueden detectar mediante avidina o estreptavidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o una actividad enzimática que se puede detectar por métodos ópticos o colorimétricos). Ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>35</sup>S, <sup>90</sup>Y, <sup>99</sup>Tc, <sup>111</sup>In, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>177</sup>Lu, <sup>166</sup>Ho o <sup>153</sup>Sm), cromógenos, marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, grupos biotínulo, epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de parejas de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión metálicos, marcadores epitópicos) y agentes magnéticos (por ejemplo, quelatos de gadolinio). Ejemplos representativos de marcadores comúnmente empleados para inmunoensayos, incluyen restos que producen luz, por ejemplo, compuestos de acridinio y restos que producen fluorescencia, por ejemplo, fluoresceína. Otros marcadores se describen en este documento. A este respecto, el resto por sí mismo no se puede marcar de manera detectable, pero puede llegar a ser detectable tras la reacción con otro resto. El uso de la expresión "marcado de manera detectable" se entiende que incluye el último tipo de marcadores detectables.

La expresión "conjugado de proteína que se une a IL-1 $\beta$ " se refiere a una proteína que se une a IL-1 $\beta$  descrita en el presente documento, ligada químicamente a un segundo resto químico, tal como un agente terapéutico o citotóxico. El término "agente" se utiliza en el presente documento para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto formado por materiales biológicos. Preferiblemente, los agentes terapéuticos o citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, toxina pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, antracina diona dihidroxi, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de los mismos. Cuando se emplea en el contexto de un inmunoensayo, un conjugado de proteína que se une a IL-1 $\beta$  puede ser un anticuerpo marcado de forma detectable, que se utiliza como anticuerpo de detección.

Los términos "cristal" y "cristalizado" tal como se utilizan en esta memoria, se refieren a una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo), o una porción de la misma que se une a antígeno, que existe en forma de un cristal. Los cristales son una forma de estado sólido de la materia que es distinto de otras formas tales como el estado sólido amorfo o el estado cristalino líquido. Los cristales están compuestos de matrices regulares tridimensionales que se repiten, de átomos, iones, moléculas (por ejemplo, proteínas tales como anticuerpos), o combinaciones moleculares (por ejemplo, complejos de antígeno/anticuerpo). Estas matrices tridimensionales están dispuestas de acuerdo con relaciones matemáticas específicas que se conocen bien en el campo. La unidad fundamental, o elemento estructural que se repite en un cristal, se llama unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en una disposición que se conforma con una simetría cristalográfica dada bien definida, proporciona la "celda unitaria" del cristal. La repetición de la celda unitaria mediante translaciones regulares en las tres dimensiones, proporciona el cristal. Véase, Giegé et al., Capítulo 1, en *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2ª ed., (Ducruix y Giegé, compiladores) (Oxford University Press, New York, 1999) págs. 1-16.

El término "polinucleótido" significa una forma polimérica de dos o más nucleótidos, ya sea ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas monocatenarias y bicatenarias de ADN.

La expresión "polinucleótido aislado" significa un polinucleótido (por ejemplo, genómico, ADNc o de origen sintético, o alguna combinación de los mismos) que, en virtud de su origen, el "polinucleótido aislado" no está asociado con todo o una porción de un polinucleótido con el que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza; está ligado funcionalmente a un polinucleótido con el que no está ligado en la naturaleza; o no está presente en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

El término "vector", tal y como se usa en el presente documento, se entiende que se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que está ligado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de una replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamífero). Otros

vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) se pueden integrar en el genoma de una célula hospedadora después de la introducción en la célula hospedadora y de ese modo se replican junto con el genoma del hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están ligados funcionalmente. Tales vectores se denominan en este documento "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector utilizada más comúnmente. Sin embargo, la invención incluye otras formas de este tipo de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus con replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que sirven para funciones equivalentes.

La expresión "ligado funcionalmente" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite actuar de la manera pretendida. Una secuencia de control "ligada funcionalmente" a una secuencia codificante, está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control. Las secuencias "ligadas funcionalmente" incluyen tanto secuencias de control de la expresión que son contiguas al gen de interés como secuencias de control de la expresión que actúan *en trans* o a una distancia para controlar el gen de interés. La expresión "secuencia de control de la expresión" tal y como se emplea en este documento, se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes a las que están ligadas. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias de iniciación, de terminación, de iniciación, de potenciación de la transcripción apropiadas; señales de procesamiento del ARN eficaces tales como señales de corte y empalme y de poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico; secuencias que potencian la eficacia de la traducción (es decir, una secuencia de consenso de Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de la proteína; y cuando se desee, secuencias que potencian la secreción de proteínas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo hospedador; en procariotas, tales secuencias de control incluyen generalmente un promotor, un sitio de unión al ribosoma y una secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotas, generalmente, tales secuencias de control incluyen promotores y una secuencia de terminación de la transcripción. La expresión "secuencias de control" se entiende que incluye componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también pueden incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de ligandos de fusión.

"Transformación", tal como se define en el presente documento, se refiere a cualquier proceso por el que un ADN exógeno entra en una célula hospedadora. La transformación puede tener lugar en condiciones naturales o artificiales, usando diversos métodos bien conocidos en la técnica. La transformación puede basarse en cualquier método conocido para la inserción de secuencias de ácido nucleico extraño en una célula hospedadora procariota o eucariota. El método se selecciona basándose en la célula hospedadora que está siendo transformada y puede incluir, pero no se limita a, una infección vírica, electroporación, lipofección y bombardeo de partículas. Tales células "transformadas" incluyen células transformadas de forma estable en las que el ADN insertado es capaz de replicarse ya sea como un plásmido de replicación autónoma o como parte del cromosoma hospedador. También incluyen células que expresan transitoriamente el ADN o ARN insertado durante períodos de tiempo limitados.

La expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), se entiende que se refiere a una célula en la que se ha introducido ADN exógeno. En una realización, la célula hospedadora comprende dos o más (por ejemplo, múltiples) ácidos nucleicos que codifican anticuerpos, tales como las células hospedadoras descritas en el documento de Patente de EE.UU. n° 7.262.028, por ejemplo. Tales expresiones se refieren no solo a la célula objeto particular, sino también a la progenie de tal célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a una mutación o a influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aun así se incluye dentro del alcance de la expresión "célula hospedadora" tal y como se usa en el presente documento. En una realización, las células hospedadoras incluyen células procariotas y eucariotas seleccionadas a partir de cualquiera de los reinos de la vida. En otra realización, las células eucariotas incluyen células de protistas, hongos, plantas y animales. En otra realización, las células hospedadoras incluyen, pero no se limitan a, la línea celular procariota *Escherichia coli*; líneas celulares de mamífero CHO, HEK 293, COS, NS0, SP2 y PER.C6; la línea celular de insecto Sf9; y la célula fúngica *Saccharomyces cerevisiae*.

Se pueden emplear técnicas convencionales para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se pueden realizar según las especificaciones del fabricante o como se hace comúnmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Las técnicas y procedimientos anteriores se pueden realizar generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y describen a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

Un "organismo transgénico", tal y como se conoce en la técnica, se refiere a un organismo que tiene células que contienen un transgén, en donde el transgén introducido en el organismo (o en un ancestro del organismo) expresa un polipéptido que no se expresa de forma natural en el organismo. Un "transgén" es una estructura artificial de

ADN, que es estable y está integrada funcionalmente en el genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla un organismo transgénico, dirigiendo la expresión de un producto génico codificado en uno o varios tipos celulares o tejidos del organismo transgénico.

5 Los términos "regulan" y "modulan" se utilizan indistintamente y, tal y como se usan en el presente documento, se refieren a un cambio o una alteración en la actividad de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de hIL-1 $\beta$ ). La modulación puede ser un aumento o una disminución en la magnitud de una determinada actividad o función de la molécula de interés. Actividades y funciones ejemplares de una molécula incluyen, pero no se limitan a, características de unión, actividad enzimática, activación del receptor celular y transducción de señales.

10 En consecuencia, el término "modulador", tal y como se usa en esta memoria, es un compuesto capaz de cambiar o alterar una actividad o función de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de hIL-1 $\beta$ ). Por ejemplo, un modulador puede causar un aumento o una disminución en la magnitud de una determinada actividad o función de una molécula, en comparación con la magnitud de la actividad o la función observada en ausencia del modulador. En ciertas realizaciones, un modulador es un inhibidor, lo que disminuye la magnitud de al menos una actividad o una función de una molécula. Inhibidores a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, anticuerpos, pepticuerpos, carbohidratos o pequeñas moléculas orgánicas. Los pepticuerpos se describen, por ejemplo, en el documento de publicación PCT n° WO 01/83525.

15 El término "agonista", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés, provoca un aumento en la magnitud de una determinada actividad o función de la molécula, en comparación con la magnitud de la actividad o la función observada en ausencia del agonista. Los agonistas particulares de interés pueden incluir, pero no se limitan a, polipéptidos de IL-1 $\beta$ , ácidos nucleicos, carbohidratos o cualquier otra molécula que se une a hIL-1 $\beta$ .

20 Los términos "antagonista" e "inhibidor", tal como se utilizan en este documento, se refieren a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés provoca una disminución en la magnitud de una determinada actividad o función de la molécula, en comparación con la magnitud de la actividad o la función observada en ausencia del antagonista. Antagonistas particulares de interés incluyen los que bloquean o modulan la actividad biológica o inmunológica de la IL-1 $\beta$  humana. Los antagonistas e inhibidores de la IL-1 $\beta$  humana pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos o cualquier otra molécula, que se une a IL-1 $\beta$  humana.

25 Tal y como se utiliza en este documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de una terapia que es suficiente para reducir o mejorar la gravedad y/o la duración de un trastorno o uno o varios síntomas del mismo; impedir el avance de un trastorno; causar la regresión de un trastorno; prevenir la recurrencia, el desarrollo, la aparición o la progresión de uno o varios síntomas asociados con un trastorno; detectar un trastorno; o aumentar o mejorar el o los efectos profilácticos o terapéuticos de otra terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico).

30 "Paciente" y "sujeto" se pueden usar indistintamente en el presente documento para referirse a un animal, tal como un mamífero, incluyendo un primate (por ejemplo, un ser humano, un mono y un chimpancé), un no primate (por ejemplo, una vaca, un cerdo, un camello, una llama, un caballo, una cabra, un conejo, una oveja, un hámster, un conejillo de indias, un gato, un perro, una rata, un ratón, una ballena), un ave (por ejemplo, un pato o un ganso) y un tiburón. Preferiblemente, un paciente o un sujeto es un ser humano, tal como un ser humano en el que se está tratando o evaluando una enfermedad, trastorno o afección, un ser humano con riesgo de contraer una enfermedad, un trastorno o una afección, un ser humano que tiene una enfermedad, un trastorno o una afección y/o un ser humano que está siendo tratado debido a una enfermedad, un trastorno o una afección.

35 El término "muestra", tal y como se usa en el presente documento, se emplea en su sentido más amplio. Una "muestra biológica", tal y como se usa en el presente documento, incluye, pero no se limita a, cualquier cantidad de una sustancia procedente de un ser vivo o que anteriormente era un ser vivo. Tales seres vivos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, primates no humanos, ratones, ratas, monos, perros, conejos y otros animales. Tales sustancias incluyen, pero no se limitan a, sangre (por ejemplo, sangre completa), plasma, suero, orina, líquido amniótico, líquido sinovial, células endoteliales, leucocitos, monocitos, otras células, órganos, tejidos, médula ósea, ganglios linfáticos y bazo.

40 "Componente", "componentes" y "al menos un componente", se refieren en general a un anticuerpo de captura, un anticuerpo de detección o conjugado, un control, un calibrador, una serie de calibradores, un panel de sensibilidad, un recipiente, un tampón, un diluyente, una sal, una enzima, un cofactor para una enzima, un reactivo de detección, un reactivo/solución de pretratamiento, un sustrato (por ejemplo, como una solución), una solución de parada y similares que se pueden incluir en un kit para el ensayo de una muestra de una prueba, tal como una muestra de orina, muestra de suero o plasma del paciente, de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento y otros métodos conocidos en la técnica. Por lo tanto, en el contexto de la presente descripción, "al menos un componente", "componente" y "componentes" pueden incluir un polipéptido u otro analito como los anteriores, tal como una composición que comprende un analito tal como polipéptido, que está opcionalmente inmovilizado sobre un soporte sólido, tal como mediante la unión a un anticuerpo anti-analito (por ejemplo, anti-polipéptido). Algunos componentes pueden estar en solución o liofilizados para una reconstitución para uso en un ensayo.

"Control" se refiere a una composición conocida por no contener analito ("control negativo") o por contener analito ("control positivo"). Un control positivo puede comprender una concentración conocida de analito. "Control", "control positivo" y "calibrador" se pueden usar indistintamente en el presente documento para referirse a una composición que comprende una concentración conocida de analito. Un "control positivo" se puede utilizar para establecer las características de rendimiento del ensayo y es un indicador útil de la integridad de los reactivos (por ejemplo, analitos).

"Punto de corte predeterminado" y "nivel predeterminado" se refieren en general a un valor de punto de corte del ensayo que se utiliza para evaluar los resultados de la eficacia del diagnóstico/pronóstico/terapia mediante la comparación de los resultados del ensayo frente al punto de corte/nivel predeterminado, en donde el punto de corte/nivel predeterminado ya se ha relacionado o asociado con varios parámetros clínicos (por ejemplo, la gravedad de la enfermedad, la progresión/no progresión/mejora, etc.). Si bien la presente descripción puede proporcionar niveles predeterminados a modo de ejemplo, es bien sabido que los valores de punto de corte pueden variar dependiendo de la naturaleza del inmunoensayo (por ejemplo, los anticuerpos empleados, etc.). Además está bien dentro de la experiencia habitual de un experto en la técnica, el adaptar la descripción de este documento a otros inmunoensayos para obtener valores de punto de corte específicos del inmunoensayo para esos otros inmunoensayos basados en esta descripción. Considerando que el valor preciso del punto de corte/nivel predeterminado puede variar entre los ensayos, las correlaciones tal y como se describen en el presente documento (si existen), deben ser de aplicación general.

Un "reactivo de pretratamiento", por ejemplo, lisis, precipitación y/o reactivo de solubilización, tal y como se usa en un ensayo de diagnóstico como se describe en el presente documento, es uno que lisa cualquier célula y/o solubiliza cualquier analito que está/están presentes en una muestra de ensayo. Un tratamiento previo no es necesario para todas las muestras, como se describe adicionalmente en este documento. Entre otras cosas, solubilizar el analito (por ejemplo, un polipéptido de interés) puede implicar la liberación del analito desde cualquiera de las proteínas de unión endógenas presentes en la muestra. Un reactivo de pretratamiento puede ser homogéneo (que no requiere una etapa de separación) o heterogéneo (que requiere una etapa de separación). Con el uso de un reactivo de pretratamiento heterogéneo existe una eliminación de cualquier proteína que se une al analito que precipita en la muestra de la prueba antes de proceder con la siguiente etapa del ensayo.

Los "reactivos de control de calidad" en el contexto de los inmunoensayos y kits descritos en este documento, incluyen, pero no se limitan a, calibradores, controles y paneles de sensibilidad. Un "calibrador" o "patrón" se utiliza normalmente (por ejemplo, uno o varios, tal como una pluralidad) a fin de establecer curvas de calibración (patrón) para la interpolación de la concentración de un analito, tal como un anticuerpo o un analito. Alternativamente, un solo calibrador, que está cerca de un punto de corte positivo/negativo predeterminado, se puede utilizar. Múltiples calibradores (es decir, más de un calibrador o una cantidad variable de calibradores) se pueden utilizar conjuntamente con el fin de comprender un "panel de sensibilidad."

"Riesgo" se refiere a la posibilidad o probabilidad de que un evento particular tenga lugar, ya sea actualmente o en algún momento en el futuro. "La estratificación del riesgo" se refiere a una serie de factores de riesgo clínicos conocidos que permite a los médicos clasificar los pacientes según un riesgo bajo, moderado, alto o más alto de desarrollar una enfermedad, un trastorno o una afección particular.

"Específico" y "especificidad" en el contexto de una interacción entre los miembros de una pareja de ligandos específicos (por ejemplo, un antígeno (o un fragmento del mismo) y un anticuerpo (o un fragmento del mismo antigénicamente reactivo)) se refieren a la reactividad selectiva de la interacción. La expresión "se une específicamente a" y expresiones análogas se refieren a la capacidad de los anticuerpos (o de fragmentos antigénicamente reactivos de los mismos) para unirse específicamente a un analito (o a un fragmento del mismo) y para no unirse específicamente a otras entidades.

"Ligando específico" es un miembro de una pareja de ligandos específicos. Una pareja de ligandos específicos comprende dos moléculas diferentes, que se unen específicamente entre sí a través de medios químicos o físicos. Por lo tanto, además de las parejas de ligandos específicos entre antígeno y anticuerpo, de inmunoensayos comunes, otras parejas de ligandos específicos pueden incluir biotina y avidina (o estreptavidina), hidratos de carbono y lectinas, secuencias de nucleótidos complementarias, moléculas efectoras y receptoras, cofactores y enzimas, inhibidores enzimáticos y enzimas y similares. Además, las parejas de ligandos específicos pueden incluir miembros que son análogos a los miembros de ligandos específicos originales, por ejemplo, un análogo de analito. Los miembros de ligandos específicos inmunoreactivos incluyen antígenos, fragmentos de antígenos y anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales y policlonales, así como complejos, fragmentos y variantes (incluyendo fragmentos de las variantes) de los mismos, ya sea aislados o producidos de forma recombinante.

"Variante" tal y como se usa en el presente documento, significa un polipéptido que difiere de un polipéptido dado (por ejemplo, IL-1 $\beta$ , BNP, NGAL o polipéptido de VIH o anticuerpo anti-polipéptido) en la secuencia de aminoácidos, mediante la adición (por ejemplo, la inserción), delección o sustitución conservadora de aminoácidos, pero que conserva la actividad biológica del polipéptido dado (por ejemplo, una variante de IL-1 $\beta$  puede competir con un anticuerpo anti-IL-1 $\beta$  por la unión a IL-1 $\beta$ ). Una sustitución conservadora de un aminoácido, es decir, la sustitución de un aminoácido por un aminoácido diferente con propiedades similares (por ejemplo, hidrofiliidad y grado y

distribución de las regiones cargadas) está reconocida en la técnica ya que implica normalmente un cambio menor. Estos cambios menores pueden identificarse, en parte, considerando el índice hidropático de los aminoácidos, tal como se entiende en la técnica (véase, por ejemplo, Kyte et al., J. Mol. Biol., 157: 105-132 (1982)). El índice hidropático de un aminoácido se basa en la consideración de su hidrofobicidad y su carga. Se conoce en la técnica que los aminoácidos con índices hidropáticos similares se pueden sustituir y todavía conservan la función proteica. En un aspecto, los aminoácidos que tienen índices hidropáticos de  $\pm 2$ , están sustituidos. La hidrofilia de los aminoácidos también se puede utilizar para revelar sustituciones que darían lugar a proteínas que conservarían la función biológica. Una consideración de la hidrofilia de los aminoácidos en el contexto de un péptido, permite el cálculo de la mayor hidrofiliidad promedio local de ese péptido, una medida útil de la que se ha informado que se correlaciona bien con la antigenicidad y la inmunogenicidad (véase, por ejemplo, el documento de patente de EE.UU. nº 4.554.101). La sustitución de aminoácidos que tienen valores de hidrofilia similares puede dar como resultado péptidos que conservan la actividad biológica, por ejemplo, la inmunogenicidad, como se entiende en la técnica. En un aspecto, las sustituciones se realizan con aminoácidos que tienen valores de hidrofilia dentro de  $\pm 2$  entre sí. Tanto el índice de hidrofobicidad como el valor de hidrofilia de los aminoácidos están influenciados por la cadena lateral particular de ese aminoácido. En consonancia con esta observación, las sustituciones de aminoácidos que son compatibles con la función biológica se entiende que dependerán de la similitud relativa de los aminoácidos y particularmente de las cadenas laterales de los aminoácidos, según lo revelado por la hidrofobicidad, hidrofilia, carga, tamaño y otras propiedades. "Variante" se puede utilizar también para describir un polipéptido o un fragmento del mismo que se ha procesado diferencialmente, tal como por proteólisis, fosforilación o cualquier otra modificación postraduccional, que todavía conserva su actividad biológica o la reactividad del antígeno, por ejemplo, la capacidad de unirse a IL-1 $\beta$ . El uso de una "variante" en el presente documento, se entiende que incluye fragmentos de una variante, a no ser que se contradiga de otro modo por el contexto.

### **I. Anticuerpos que se unen a IL-1 $\beta$ humana**

Un aspecto de la presente descripción proporciona anticuerpos monoclonales murinos aislados, o porciones de los mismos que se unen a antígeno, que se unen a IL-1 $\beta$  con alta afinidad, una tasa de disociación lenta y una capacidad elevada de neutralización. Un segundo aspecto de la descripción proporciona anticuerpos quiméricos que se unen a IL-1 $\beta$ . Un tercer aspecto de la descripción proporciona anticuerpos injertados con CDRs, o porciones de las mismas que se unen a antígeno, que se unen a IL-1 $\beta$ . Un cuarto aspecto de la descripción proporciona anticuerpos humanizados, o porciones de los mismos que se unen a antígeno, que se unen a IL-1 $\beta$ . Un quinto aspecto de la descripción proporciona moléculas de inmunoglobulina de doble dominio variable (DVD-Ig<sup>®</sup>) que se unen a IL-1 $\beta$  y a otra diana. Preferiblemente, los anticuerpos, o porciones de los mismos, son anticuerpos aislados. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención son anticuerpos neutralizantes anti-IL-1 $\beta$  humana.

### **A. Método de preparación de anticuerpos anti-IL-1 $\beta$**

Los anticuerpos anti-IL-1 $\beta$  de la presente descripción se pueden preparar mediante cualquiera de una serie de métodos conocidos en la técnica.

#### **1. Anticuerpos monoclonales anti-IL-1 $\beta$ que emplean tecnología de hibridoma**

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando una amplia variedad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo el uso de tecnologías de hibridoma, recombinante y de visualización en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando técnicas de hibridoma incluyendo aquellas conocidas en la técnica y que se describen, por ejemplo, en Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, 2<sup>a</sup> ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988); Hammerling et al., compiladores, " *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*", En *Research Monographs in Immunology*, vol. 3 (JL Turk, Editor General) (Elsevier, Nueva York, 1981) págs. 563-587. La expresión "anticuerpo monoclonal" tal y como se usa en el presente documento, no se limita a anticuerpos producidos a través de la tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se obtiene a partir de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o de fago y no el método por el cual se produce.

Los métodos para producir y escrutar anticuerpos anti-IL-1 $\beta$  específicos usando tecnología de hibridoma son rutinarios y bien conocidos en la técnica. En una realización, la presente descripción proporciona métodos para generar anticuerpos monoclonales así como anticuerpos producidos por el método que comprende cultivar una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo de la descripción, en donde, preferiblemente, el hibridoma se genera mediante la fusión de esplenocitos aislados a partir de un ratón inmunizado con un antígeno de la invención con células de mieloma y después seleccionando los hibridomas resultantes de la fusión, en busca de clones de hibridoma que secretan un anticuerpo capaz de unirse a un polipéptido de la descripción. Brevemente, los ratones se pueden inmunizar con un antígeno de IL-1 $\beta$ . En una realización ejemplar, el antígeno de IL-1 $\beta$  se administra con un adyuvante para estimular la respuesta inmune. Tales adyuvantes incluyen adyuvante de Freund completo o incompleto, RIBI (dipéptidos de muramilo) o ISCOM (complejos inmunoestimulantes). Tales adyuvantes pueden proteger al polipéptido de una dispersión rápida mediante el secuestro en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan al hospedador a secretar factores que son quimiotácticos para macrófagos y otros componentes del sistema inmune. Preferiblemente, si se está administrando un polipéptido, la pauta de inmunización implicará dos o más administraciones del polipéptido, que se desarrollan durante varias semanas.



Después de la inmunización de un animal con un antígeno de IL-1 $\beta$ , los anticuerpos y/o las células productoras de anticuerpos se pueden obtener a partir del animal. Un suero que contiene anticuerpos anti-IL-1 $\beta$  se obtiene a partir del animal mediante sangrado o sacrificio del animal. El suero se puede emplear tal y como se obtiene a partir del animal, una fracción de inmunoglobulina se puede obtener a partir del suero o los anticuerpos anti-IL-1 $\beta$  se pueden purificar a partir del suero. El suero o las inmunoglobulinas obtenidas de este modo son policlonales, teniendo así una serie heterogénea de propiedades.

Una vez que se detecta una respuesta inmune, por ejemplo, se detectan anticuerpos específicos del antígeno IL-1 $\beta$  en el suero de ratón, se extirpa el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan después por técnicas bien conocidas con cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo, células de la línea celular SP20 disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia). Los hibridomas se seleccionan y se clonan mediante una dilución limitada. Los clones del hibridoma se someten entonces a ensayo por métodos conocidos en la técnica en busca de células que secretan anticuerpos capaces de unirse a IL-1 $\beta$ . El fluido ascítico, que generalmente contiene altos niveles de anticuerpos, se puede generar mediante la inmunización de ratones con clones positivos para el hibridoma.

En otra realización, hibridomas inmortalizados productores de anticuerpos se pueden preparar a partir del animal inmunizado. Después de la inmunización, el animal se sacrifica y los linfocitos B esplénicos se fusionan con células de mieloma inmortalizadas, como es bien conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow et al., *supra*. En una realización ejemplar, las células de mieloma no secretan polipéptidos de inmunoglobulinas (una línea celular no secretora). Después de la fusión y la selección con antibiótico, los hibridomas se escrutan utilizando IL-1 $\beta$ , o una porción de la misma, o una célula que expresa IL-1 $\beta$ . En una realización ejemplar, el escrutinio inicial se lleva a cabo utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA), preferiblemente un ELISA. Un ejemplo de escrutinio con ELISA se proporciona en el documento de publicación PCT nº WO 00/37504.

Los hibridomas productores de anticuerpos anti-IL-1 $\beta$  se seleccionan, se clonan y se escrutan adicionalmente en busca de características deseables, incluyendo un crecimiento fuerte del hibridoma, una producción elevada de anticuerpos y características de anticuerpos deseables, como se describe más adelante. Los hibridomas se pueden cultivar y expandir *in vivo* en animales singénicos, en animales que carecen de sistema inmune, por ejemplo, ratones sin pelo, o en un cultivo celular *in vitro*. Los métodos de selección, clonación y expansión de hibridomas son bien conocidos por los expertos normales en la técnica.

En una realización ejemplar, los hibridomas son hibridomas de ratón, tal y como se han descrito anteriormente. En otra realización preferida, los hibridomas se producen en una especie no humana, no de ratón tal como ratas, ovejas, cerdos, cabras, vacas o caballos. En otra realización, los hibridomas son hibridomas humanos, en los que un mieloma humano no secretor se fusiona con una célula humana que expresa un anticuerpo anti-IL-1 $\beta$ .

Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos pueden generarse por técnicas conocidas. Por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> de la descripción se pueden producir mediante una escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, utilizando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')<sub>2</sub>). Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> contienen la región variable, la región constante de la cadena ligera y el dominio CHI de la cadena pesada.

## 2. Anticuerpos monoclonales anti-IL-1 $\beta$ empleando SLAM

En otro aspecto de la descripción, los anticuerpos recombinantes se generan a partir de linfocitos individuales, aislados utilizando un procedimiento denominado en la técnica el método de anticuerpos de linfocitos seleccionados (SLAM), como se describe en los documentos de Patente de EE.UU. nº 5.627.052; Publicación PCT nº WO 92/02551; y Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 7843-7848 (1996). En este método, células individuales que secretan anticuerpos de interés, por ejemplo, linfocitos obtenidos a partir de uno cualquiera de los animales inmunizados descritos en la Sección 1, se escrutan usando un ensayo de placa hemolítica específico de antígeno, en donde el antígeno IL-1 $\beta$ , una subunidad de IL-1 $\beta$  o un fragmento de la misma, está acoplada a glóbulos rojos de oveja usando un enlazador, tal como biotina y se utilizan para identificar células individuales que secretan anticuerpos con especificidad para IL-1 $\beta$ . Después de la identificación de las células que secretan el anticuerpo de interés, los ADNc de la región variable de la cadena pesada y ligera (VH y VL) son rescatados de las células mediante PCR y transcriptasa inversa, y estas regiones variables pueden expresarse entonces, en el contexto de regiones constantes de inmunoglobulina apropiadas (por ejemplo, regiones constantes humanas), en células hospedadoras de mamífero, tales como células COS o CHO. Las células hospedadoras transfectadas con las secuencias de inmunoglobulina amplificadas, obtenidas a partir de linfocitos seleccionados *in vivo*, se pueden someter entonces a un análisis adicional y una selección *in vitro*, por ejemplo, mediante una clasificación de las células transfectadas para aislar células que expresan anticuerpos de IL-1 $\beta$ . Las secuencias de inmunoglobulina amplificadas se pueden manipular adicionalmente *in vitro*, tal como mediante métodos de maduración por afinidad *in vitro*, tales como los descritos en los documentos de publicación PCT nº WO 97/29131 y la publicación PCT nº WO 00/56772.

## 3. Anticuerpos monoclonales anti-IL-1 $\beta$ empleando animales transgénicos

En otra realización de la descripción, los anticuerpos se producen mediante la inmunización de un animal no humano que comprende algunos, o todos, los loci de la inmunoglobulina humana, con un antígeno IL-1 $\beta$ . En una realización ejemplar, el animal no humano es un ratón transgénico XENOMOUSE, una cepa de ratón modificada genéticamente que comprende fragmentos grandes de los loci de la inmunoglobulina humana y no es capaz de producir anticuerpos de ratón. Véase, por ejemplo, Green et al., *Nature Genetics*, 7: 13-21 (1994) y los documentos de Patente de EE.UU. n° 5.916.771; 5.939.598; 5.985.615; 5.998.209; 6.075.181; 6.091.001; 6.114.598 y 6.130.364. Véanse también los documentos de Publicación PCT n° WO 91/10741, publicado el 25 de julio, 1991; WO 94/02602, publicado el 3 de febrero, 1994; WO 96/34096 y WO 96/33735, ambos publicados el 31 de octubre, 1996; WO 98/16654, publicado el 23 de abril, 1998; WO 98/24893, publicado el 11 de junio, 1998; WO 98/50433, publicado el 12 de noviembre, 1998; WO 99/45031, publicado el 10 de septiembre, 1999; WO 99/53049, publicado el 21 de octubre, 1999; WO 00/09560, publicado el 24 de febrero, 2000; y WO 00/037504, publicado el 29 de junio, 2000. El ratón transgénico XENOMOUSE<sup>®</sup> produce un repertorio humano de tipo adulto de anticuerpos totalmente humanos y genera AcMos humanos específicos de antígeno. El ratón transgénico XENOMOUSE<sup>®</sup> contiene aproximadamente un 80% del repertorio de anticuerpos humanos mediante la introducción de fragmentos de YAC con una configuración de línea germinal, con un tamaño de megabases, de los loci de la cadena pesada y x loci de la cadena ligera humana. Véase, Mendez et al., *Nature Genetics*, 15: 146-156 (1997); y Green y Jakobovits, *J. Exp. Med.*, 188: 483-495 (1998).

#### 4. Anticuerpos monoclonales anti-IL-1 $\beta$ empleando bancos de anticuerpos recombinantes

Los métodos *in vitro* también se pueden emplear para preparar los anticuerpos de la descripción, en donde un banco de anticuerpos se escruta para identificar un anticuerpo que tiene la especificidad de unión deseada. Los métodos para tal escrutinio de bancos de anticuerpos recombinantes son bien conocidos en la técnica e incluyen métodos descritos, por ejemplo, en los documentos de Ladner et al., patente de EE.UU. n° 5.223.409; Kang et al., Publicación PCT n° WO 92/18619; Dower et al., Publicación PCT n° WO 91/17271; Winter et al., Publicación PCT n° WO 92/20791; Markland et al., Publicación PCT n° WO 92/15679; Breiting et al., Publicación PCT n° WO 93/01288; McCafferty et al., Publicación PCT n° WO 92/01047; Garrard et al., Publicación PCT n° WO 92/09690; Fuchs et al., *Bio/Technology*, 9: 1369-1372 (1991); Hay et al., *Hum. Antibod. Hybridomas*, 3: 81-85 (1992); Huse et al., *Science*, 246: 1275-1281 (1989); McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990); Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992); Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576-3580 (1992); Garrard et al., *Bio/Technology*, 9: 1373-1377 (1991); Hoogenboom et al., *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991); y Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7.978-7982 (1991); Publicación de EE.UU. n° 2003/0186374; y la Publicación PCT n° WO 97/29131.

El banco de anticuerpos recombinantes puede proceder de un sujeto inmunizado con IL-1 $\beta$ , o una porción de IL-1 $\beta$ . Alternativamente, el banco de anticuerpos recombinantes puede ser de un sujeto sin tratar, es decir, uno que no ha sido inmunizado con IL-1 $\beta$ , tal como un banco de anticuerpos humanos de un sujeto humano que no ha sido inmunizado con IL-1 $\beta$  humana. Los anticuerpos de la descripción se seleccionan mediante el escrutinio del banco de anticuerpos recombinantes con el péptido que comprende IL-1 $\beta$  humana, para seleccionar de ese modo aquellos anticuerpos que reconocen IL-1 $\beta$ . Los métodos para llevar a cabo tal escrutinio y selección son bien conocidos en la técnica, tal como se describen en las referencias en el párrafo anterior. Para seleccionar anticuerpos de la descripción que tienen afinidades de unión particulares hacia IL-1 $\beta$  humana, tales como los que se disocian de IL-1 $\beta$  humana con una tasa de  $K_{off}$  particular constante, se puede utilizar el método conocido en la técnica de resonancia de plasmón de superficie para seleccionar anticuerpos que tienen la constante de la tasa  $K_{off}$  deseada. Para seleccionar anticuerpos de la invención que tienen una actividad neutralizante particular frente a IL-1 $\beta$  humana, tales como aquellos con una  $CI_{50}$  particular, se pueden utilizar métodos convencionales conocidos en la técnica para evaluar la inhibición de la actividad de IL-1 $\beta$  humana.

En un aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo aislado, o a una porción del mismo que se une a antígeno, que se une a IL-1 $\beta$  humana. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo neutralizante. En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante o un anticuerpo monoclonal.

Por ejemplo, los anticuerpos de la presente descripción también se pueden generar utilizando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en fagos, los dominios de anticuerpos funcionales se muestran en la superficie de partículas de fagos que son portadores de las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En un particular, un fago de este tipo se puede utilizar para presentar dominios que se unen a antígeno expresados a partir de un repertorio o un banco de anticuerpos combinatorio (por ejemplo, humano o murino). Los fagos que expresan un dominio que se une a antígeno que se une al antígeno de interés, se pueden seleccionar o identificar con un antígeno, por ejemplo, usando un antígeno marcado o un antígeno unido o capturado sobre una superficie sólida o una perla. Los fagos usados en estos métodos son normalmente fagos filamentosos que incluyen dominios que se unen a fd y M13 expresados a partir de un fago con dominios de anticuerpo de Fab, Fv o Fv estabilizado con disulfuro, fusionados recombinantemente con la proteína del gen II o del gen VIII del fago. Ejemplos de métodos de presentación en fagos que pueden usarse para preparar los anticuerpos de la presente invención, incluyen los descritos en Brinkmann et al., *J. Immunol. Methods*, 182: 41-50 (1995); Ames et al., *J. Immunol. Methods*, 184: 177-186 (1995); Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol.*, 24: 952-958 (1994); Persic et al., *Gene*, 187: 9-18 (1997); Burton et al., *Adv. Immunol.*, 57: 191-280 (1994); documentos de publicaciones PCT n° WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047 (PCT/GB91/01134); WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982;

WO 95/20401; y las patentes de EE.UU. n° 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

5 Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección en fagos, las regiones que codifican el anticuerpo procedentes del fago, se pueden aislar y usar para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento deseado que se une a antígeno y expresar en cualquier hospedador deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levaduras y bacterias, por ejemplo, como se describe en detalle a continuación. Por ejemplo, las técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub> también pueden emplearse usando métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en la publicación PCT n° WO 92/22324; Mullinax et al., *BioTechniques*, 12(6): 864-869 (1992); y Sawai et al., *Am. J. Reprod. Immunol.*, 34: 26-34 (1995); y Better et al., *Science*, 240: 1041-1043 (1988). Ejemplos de técnicas que pueden usarse para producir Fvs y anticuerpos de cadena sencilla incluyen las descritas en los documentos de Patente de EE.UU. n° 4.946.778. Y 5.258.498; Huston et al., *Methods Enzymol.*, 203: 46-88 (1991); Shu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7995-7999 (1993); y Skerra et al., *Science*, 240: 1038-1041 (1988).

15 Como alternativa al escrutinio de bancos de anticuerpos recombinantes mediante presentación en fagos, otras metodologías conocidas en la técnica para el escrutinio de grandes bancos combinatorios se pueden aplicar para la identificación de anticuerpos con especificidad doble de la invención. Un tipo de sistema de expresión alternativo es uno en el que el banco de anticuerpos recombinantes se expresa como fusiones de ARN-proteína, como se describe en el documento de Publicación PCT n° WO 98/31700 de Szostak y Roberts; y en Roberts y Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 12297-12302 (1997). En este sistema, se crea una fusión covalente entre un ARNm y el péptido o la proteína que la codifica mediante una traducción *in vitro* de ARNm sintéticos que son portadores de puromicina, un antibiótico aceptor de peptidilo, en su extremo 3'. Por lo tanto, un ARNm específico puede enriquecerse a partir de una mezcla compleja de ARNm (por ejemplo, un banco combinatorio) basándose en las propiedades del péptido o la proteína codificada, por ejemplo, un anticuerpo o una porción del mismo, de modo que se une el anticuerpo, o a una porción del mismo, con el antígeno de especificidad doble. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos, o porciones de los mismos, recuperadas con el escrutinio de dichos bancos, pueden expresarse por medios recombinantes como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, en células hospedadoras de mamífero) y, además, se pueden someter a una maduración por afinidad adicional mediante rondas adicionales de escrutinio de fusiones de ARNm-péptido, en las que se han introducido mutaciones en la o las secuencias seleccionadas originalmente, o por otros métodos para la maduración por afinidad *in vitro* de anticuerpos recombinantes, como se ha descrito anteriormente.

25 En otro enfoque, los anticuerpos de la presente descripción también se pueden generar usando métodos de presentación en levadura conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en levadura, se utilizan métodos genéticos para ligar dominios de anticuerpos a la pared celular de la levadura y presentarlos sobre la superficie de la levadura. En particular, una levadura de este tipo se puede utilizar para presentar dominios que se unen a antígeno expresados a partir de un repertorio o un banco de anticuerpos combinatorio (por ejemplo, humano o murino). Ejemplos de métodos de presentación en levadura que se pueden utilizar para preparar los anticuerpos de la presente descripción incluyen los descritos por Wittrup et al. en el documento de Patente de EE.UU. n° 6.699.658.

#### **B. Producción de anticuerpos recombinantes de IL-1 $\beta$**

40 Los anticuerpos de la presente descripción se pueden producir por cualquiera entre una serie de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la expresión desde células hospedadoras, en donde el o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesadas y ligeras se transfectan en una célula hospedadora mediante técnicas convencionales. Las diversas formas del término "transfección" se entiende que incluyen una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es posible expresar los anticuerpos de la descripción en células hospedadoras procariotas o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas es preferible y lo más preferible en células hospedadoras de mamífero, porque tales células eucariotas (y en particular las células de mamífero) son más propensas que las células procariotas para ensamblar y secretar un anticuerpo correctamente plegado e inmunológicamente activo.

50 Las células hospedadoras de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la descripción incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4216-4220 (1980), usadas con un marcador seleccionable con DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman y Sharp, *J. Mol. Biol.*, 159: 601-621 (1982)), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos se introducen en células hospedadoras de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que crecen las células hospedadoras. Los anticuerpos pueden recuperarse desde el medio de cultivo usando métodos convencionales de purificación de proteínas.

60 Las células hospedadoras también se pueden utilizar para producir fragmentos de anticuerpos funcionales, tales

como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entenderá que variaciones sobre el procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente descripción. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula hospedadora con ADN que codifica fragmentos funcionales de la cadena ligera y/o la cadena pesada de un anticuerpo de esta invención. La tecnología de ADN recombinante también puede usarse para eliminar alguna parte, o todo, el ADN que codifica una o ambas de las cadenas ligeras y pesadas que no es necesario para la unión a los antígenos de interés. Las moléculas expresadas a partir de tales moléculas de ADN truncadas también están incluidas en los anticuerpos de la descripción. Además, se pueden producir anticuerpos bifuncionales en los que una cadena pesada y una ligera son un anticuerpo de la invención y la otra cadena pesada y ligera son específicas de un antígeno distinto de los antígenos de interés, mediante reticulación de un anticuerpo de la descripción con un segundo anticuerpo mediante métodos de reticulación química convencionales.

En un sistema a modo de ejemplo para la expresión recombinante de un anticuerpo, o una porción del mismo que se une a un antígeno, de la descripción, un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo, se introduce en células CHO dhfr- mediante transfección mediada con fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos están ligados funcionalmente cada uno con elementos reguladores de potenciador CMV/promotor AdMLP para impulsar niveles elevados de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también es portador de un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector, usando selección/amplificación con metotrexato. Las células hospedadoras transformantes seleccionadas se cultivan para permitir una expresión de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo y se recupera un anticuerpo intacto desde el medio de cultivo. Se emplean técnicas de biología molecular convencionales para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospedadoras, seleccionar los transformantes, cultivar las células hospedadoras y recuperar el anticuerpo desde el medio de cultivo. Además, la descripción proporciona un método para sintetizar un anticuerpo recombinante de la descripción mediante el cultivo de una célula hospedadora de la invención en un medio de cultivo adecuado hasta que se sintetiza un anticuerpo recombinante de la descripción. El método puede comprender además aislar el anticuerpo recombinante desde el medio de cultivo.

### 1. Anticuerpos quiméricos anti-IL-1 $\beta$ humana

Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo se obtienen a partir de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable obtenida a partir de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica y se describen en detalle en la sección de Ejemplos. Véase, por ejemplo, Morrison, S.L., *Science*, 229: 1202-1207 (1985); Oi et al., *BioTechniques*, 4: 214-221 (1986); Gillies et al., *J. Immunol. Methods*, 125: 191-202 (1989); documentos de patentes de EE.UU. n° 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397. Además, se pueden emplear las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" ((Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984); Neuberger et al., *Nature*, 312: 604-608 (1984); Takeda et al., *Nature*, 314: 452-454 (1985), mediante genes de corte y empalme procedentes de una molécula de anticuerpo de ratón con especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada.

En una realización, los anticuerpos quiméricos de la descripción se producen mediante la sustitución de la región constante de la cadena pesada de los anticuerpos monoclonales murinos anti-IL-1 $\beta$  humana, descritos en la sección 1, por una región constante de IgG1 humana.

### 2. Anticuerpos anti-IL-1 $\beta$ injertados con CDRs

Los anticuerpos injertados con CDRs de la descripción comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano, en donde una o varias de las regiones CDRs de V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub> se sustituyen por secuencias de CDRs de los anticuerpos murinos de la descripción. Una secuencia de la región estructural de cualquier anticuerpo humano puede servir como molde para el injerto de CDRs. Sin embargo, el reemplazo de una cadena lineal en una región estructural de este tipo, conduce frecuentemente a alguna pérdida de afinidad de unión hacia el antígeno. Cuanto más homólogo es un anticuerpo humano con el anticuerpo murino original, hay menos probabilidad de que la combinación de las CDRs murinas con la región estructural humana introduzca distorsiones en las CDRs, lo que podría reducir la afinidad. Por lo tanto, es preferible que la región estructural variable humana que se elige para reemplazar la región estructural variable murina aparte de las CDRs, tenga al menos una identidad de secuencia del 65% con la región estructural variable del anticuerpo murino. Es más preferible que las regiones variables humanas y murinas, aparte de las CDRs, tengan al menos un 70% de identidad de secuencia. Es aún más preferible que las regiones variables humanas y murinas, aparte de las CDRs, tengan al menos un 75% de identidad de secuencia. Lo más preferible es que las regiones variables humanas y murinas, aparte de las CDRs, tengan al menos un 80% de identidad de secuencia. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, los documentos de Patente Europea n° EP 0 239 400; Publicación PCT n° WO 91/09967; patentes de EE.UU. n° 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089. Para el recubrimiento o el revestimiento de anticuerpos, véanse, por ejemplo, los documentos de Patente Europea n° EP 0 592 106 y EP 0 519 596; Padlan, *Mol. Immunol.*, 28(4/5): 489-498 (1991); Studnicka et al., *Protein Eng.*, 7(6): 805-814 (1994); y Roguska et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 969-973 (1994)). En cuanto al intercambio al azar de cadenas de anticuerpos, véase, por ejemplo, el documento de Patente de EE.UU. n° 5.565.352.

### 3. Anticuerpos anti-IL-1 $\beta$ humana humanizados

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos obtenidas a partir de un anticuerpo de una especie no humana que se une al antígeno deseado que tiene una o varias regiones determinantes de complementariedad (CDRs) procedentes del anticuerpo de una especie no humana y regiones estructurales de una molécula de inmunoglobulina humana. Secuencias de Ig humanas conocidas se describen, por ejemplo, en los sitios de la red mundial: [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez-](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/) /query.fcgi; [www.atcc.org/phage/hdb.html](http://www.atcc.org/phage/hdb.html); [www.sciquest.com/](http://www.sciquest.com/); [www.abcam.com/](http://www.abcam.com/); [www.antibodyresource.com/onlinecomp.html](http://www.antibodyresource.com/onlinecomp.html); [www.public.iastate.edu/about.pedro/research\\_tools.html](http://www.public.iastate.edu/about.pedro/research_tools.html); [www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html](http://www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html); [www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm](http://www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm); [www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html](http://www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html); [www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/](http://www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/); [www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/m-ikeimages.html](http://www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/m-ikeimages.html); [www.antibodyresource.com/](http://www.antibodyresource.com/); [mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html](http://mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html); [www.immunologylink.com/](http://www.immunologylink.com/); [pathbox.wustl.edu/about.hcenter/index.html](http://pathbox.wustl.edu/about.hcenter/index.html); [www.biotech.ufl.edu/about.hcl/](http://www.biotech.ufl.edu/about.hcl/); [www.pebio.com/pa/340913/340913.html](http://www.pebio.com/pa/340913/340913.html); [www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/](http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/); [www.m.ehime-u.ac.jp/about.yasuhito/Elisa.html](http://www.m.ehime-u.ac.jp/about.yasuhito/Elisa.html); [www.biodesign.com/table.asp](http://www.biodesign.com/table.asp); [www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html](http://www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html); [www.biotech.ufl.edu/about.fccl/protocol.html](http://www.biotech.ufl.edu/about.fccl/protocol.html); [www.isac-net.org/sites\\_geo.html](http://www.isac-net.org/sites_geo.html); [aximtl.imt.uni-marburg.de/about.rek/AEP-Start.html](http://aximtl.imt.uni-marburg.de/about.rek/AEP-Start.html); [baserv.uci.kun.nl/about.jraats/links.html](http://baserv.uci.kun.nl/about.jraats/links.html); [www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/](http://www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/); [www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html); [www.ibt.unam.mx/vir/V\\_mice.html](http://www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html); [imgt.cnusc.fr:8104/](http://imgt.cnusc.fr:8104/); [www.biochem.ucl.ac.uk/about.martin/abs/index.html](http://www.biochem.ucl.ac.uk/about.martin/abs/index.html); [antibody.bath.ac.uk/](http://antibody.bath.ac.uk/); [abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html](http://abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html); [www.unizh.ch/about.honegger/AHOseminar/Slide01.html](http://www.unizh.ch/about.honegger/AHOseminar/Slide01.html); [www.cryst.bbk.ac.uk/about.ubcg07s/](http://www.cryst.bbk.ac.uk/about.ubcg07s/); [www.nimr.mrc.ac.uk/CC/caewg/caewg.htm](http://www.nimr.mrc.ac.uk/CC/caewg/caewg.htm); [www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/h-umanisation/TAHHP.html](http://www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/h-umanisation/TAHHP.html); [www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat\\_aim.html](http://www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html); [www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html](http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html); [www.cryst.bioc.cam.ac.uk/abo-ut.fmolina/Webpages/Pept/spottech.html](http://www.cryst.bioc.cam.ac.uk/abo-ut.fmolina/Webpages/Pept/spottech.html); [www.jerini.de/fr/roducts.htm](http://www.jerini.de/fr/roducts.htm); [www.patents.ibm.com/ibm.html](http://www.patents.ibm.com/ibm.html). Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983). Tales secuencias importadas se pueden emplear para reducir la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar la unión, la afinidad, la tasa de asociación, la tasa de disociación, la avidéz, la especificidad, la semivida o cualquier otra característica adecuada, como se conoce en la técnica.

Los residuos estructurales (FR) en las regiones estructurales humanas pueden estar sustituidos por el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión del antígeno. Estas sustituciones estructurales se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el modelado de las interacciones de los residuos de las CDRs y los estructurales para identificar residuos estructurales importantes para la unión al antígeno y la comparación de secuencias para identificar residuos estructurales inusuales en posiciones particulares. Véase, por ejemplo, Queen et al., documento de Patente de EE.UU. n° 5.585.089; Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988). Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis de la posible función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias de consenso y de importación, de manera que se consigue la característica deseada del anticuerpo, tal como una mayor afinidad hacia el o los antígenos diana. En general, los residuos de CDRs están implicados directamente y más sustancialmente en influir en la unión al antígeno. Los anticuerpos se pueden humanizar usando una variedad de métodos conocidos en la técnica, tales como, pero no limitados a los descritos en Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988); Sims et al., J. Immunol., 151: 2296-2308 (1993); Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987); Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285-4289 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151: 2623-2632 (1993); Padlan, Mol. Immunol., 28(4/5): 489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Eng., 7(6): 805-814 (1994); Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 969-973 (1994); documentos de Publicación PCT n° WO 91/09967; WO 90/14443; WO 90/14424; WO 90/14430; WO 99/06834 (PCT/US98/16280); WO 97/20032 (PCT/US96/18978); WO 92/11272 (PCT/US91/09630); WO 92/03461 (PCT/US91/05939); WO 94/18219 (PCT/US94/01234); WO 92/01047 (PCT/GB91/01134); y WO 93/06213 (PCT/GB92/01755); documentos de Patente Europea n° EP 0 592 106; EP 0 519 596 y EP 0 239 400; patentes de EE.UU. n° 5.565.332; 5.723.323; 5.976.862; 5.824.514; 5.817.483; 5.814.476; 5.763.192; 5.723.323; 5.766.886; 5.714.352; 6.204.023; 6.180.370; 5.693.762; 5.530.101; 5.585.089; 5.225.539 y 4.816.567.

### 5. Proteínas de unión DVD-Ig® anti-IL-1 $\beta$

También se proporcionan proteínas de unión de inmunoglobulinas con un dominio doble variable (DVD-Igs) que se unen a uno o varios epítopos de IL-1 $\beta$ . Una proteína de unión DVD-Ig también se puede unir a un epítipo de IL-1 $\beta$  y a un epítipo de un segundo antígeno diana distinto de un polipéptido de IL-1 $\beta$ . Una realización ejemplar de tales moléculas DVD-Ig comprende una cadena pesada que comprende la fórmula estructural VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de la cadena pesada, VD2 es un segundo dominio variable de la cadena pesada, C es un dominio constante de la cadena pesada, X1 es un enlazador con la condición de que no sea CH1, X2 es una región Fc y n es 0 o 1 y preferiblemente 1; y una cadena ligera que comprende la fórmula estructural VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de la cadena ligera, VD2 es un

segundo dominio variable de la cadena ligera, C es un dominio constante de la cadena ligera, X1 es un enlazador con la condición de que no sea CH1 y X2 no comprende una región Fc; y n es 0 o 1 y preferiblemente 1. Tal DVD-Ig puede comprender dos de tales cadenas pesadas y dos de tales cadenas ligeras, en donde cada cadena comprende dominios variables ligados en tándem *sin* una región constante intercalada entre las regiones variables, en donde una cadena pesada y una cadena ligera se asocian para formar dos sitios de unión a antígeno en tándem, y una pareja de cadenas pesadas y ligeras se puede asociar con otra pareja de cadenas pesadas y ligeras para formar una proteína de unión tetramérica con cuatro sitios de unión a antígeno. En otra realización, una molécula DVD-Ig puede comprender cadenas pesadas y ligeras que comprenden cada una tres dominios variables, por ejemplo, VD1, VD2, VD3, ligados en tándem sin una región constante intercalada entre los dominios variables, en donde una pareja de cadenas pesadas y ligeras se puede asociar para formar tres sitios de unión a antígeno y en donde una pareja de cadenas pesadas y ligeras se puede asociar con otra pareja de cadenas pesadas y ligeras para formar una proteína de unión tetramérica con seis sitios de unión a antígeno.

Cada dominio variable (VD) en una DVD-Ig se puede obtener a partir de uno o varios anticuerpos monoclonales "parentales" que se unen a uno o varios antígenos o epítomos deseados, tales como antígenos o epítomos de IL-1 $\beta$  y/o de IL-1 $\alpha$ .

#### A. Generación de anticuerpos monoclonales parentales

Los dominios variables de la proteína de unión DVD-Ig se pueden obtener a partir de anticuerpos parentales, incluyendo anticuerpos monoclonales (AcMos), capaces de unirse a antígenos de interés. Estos anticuerpos pueden ser de origen natural o se pueden generar por tecnología recombinante. Se entiende que si un anticuerpo que se une a un antígeno o un epítomo diana deseado es policlonal, entonces todavía es necesario obtener los dominios variables de un sitio que se une a antígeno de un anticuerpo aislado procedente de la población policlonal, es decir, de un solo miembro monoclonal de la población policlonal, para su uso en la generación de una DVD-Ig. Los anticuerpos monoclonales se pueden generar mediante cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento (véanse las secciones A.1.-A.4., más arriba).

#### B. Criterios para la selección de anticuerpos monoclonales parentales

Una realización de la invención se refiere a la selección de anticuerpos parentales con al menos una o varias propiedades deseadas en la molécula DVD-Ig. En una realización, la propiedad deseada se selecciona entre uno o varios parámetros de anticuerpo. En otra realización, los parámetros de anticuerpo se seleccionan a partir del grupo que consiste en especificidad del antígeno, afinidad hacia el antígeno, potencia, función biológica, reconocimiento de epítomos, estabilidad, solubilidad, eficacia de la producción, inmunogenicidad, farmacocinética, biodisponibilidad, reactividad cruzada de tejidos y unión a antígenos ortólogos.

##### B1. Afinidad hacia el antígeno

La afinidad deseada de un AcMo terapéutico puede depender de la naturaleza del antígeno y el criterio de valoración terapéutico deseado. En una realización, los anticuerpos monoclonales tienen mayores afinidades ( $K_d = 0,01-0,50$  pM) cuando se bloquea una interacción entre citocina-receptor de citocina, ya que tal interacción generalmente son interacciones de alta afinidad (por ejemplo, intervalos <pM - <nM). En tales casos, la afinidad del AcMo hacia su diana debe ser igual o mejor que la afinidad de la citocina (ligando) hacia su receptor. Por otra parte, el AcMo con menor afinidad (intervalo >nM) podría ser terapéuticamente eficaz, por ejemplo, en el aclaramiento de proteínas potencialmente patógenas, circulantes, por ejemplo, anticuerpos monoclonales que se unen, secuestran y aclaran especies circulantes de un antígeno diana, tales como A- $\beta$  amiloide. En otros casos, la reducción de la afinidad de un AcMo de alta afinidad existente mediante mutagénesis dirigida al sitio o empleando un AcMo con menor afinidad hacia su diana, se podría utilizar para evitar efectos secundarios potenciales, por ejemplo, un AcMo con afinidad elevada puede secuestrar o neutralizar todas sus dianas previstas, con lo que agotan completamente/eliminan la o las funciones de la proteína diana. En este escenario, un AcMo de baja afinidad puede secuestrar/neutralizar una fracción de la diana que puede ser responsable de los síntomas de la enfermedad (los niveles patológicos o de sobreproducción), permitiendo así que una fracción de la diana continúe realizando su o sus funciones fisiológicas normales. Por lo tanto, se puede reducir la  $K_d$  para ajustar la dosis y/o reducir los efectos secundarios. La afinidad del AcMo parental podría desempeñar un papel para dirigirlo de forma apropiada a moléculas de la superficie celular para lograr un resultado terapéutico deseado. Por ejemplo, si una diana se expresa sobre células de cáncer con alta densidad y sobre células normales con baja densidad, un AcMo de menor afinidad se unirá a un mayor número de dianas sobre las células tumorales que a las células normales, lo que produce una eliminación de las células tumorales a través de ADCC o CDC, y por lo tanto podría tener efectos terapéuticamente deseables. Por lo tanto, la selección de un AcMo con afinidad deseada puede ser relevante para dianas tanto solubles como de superficie.

La señalización a través de un receptor después de la interacción con su ligando puede depender de la afinidad de la interacción receptor-ligando. Del mismo modo, es concebible que la afinidad de un AcMo hacia un receptor de superficie pueda determinar la naturaleza de la señalización intracelular y si el AcMo puede entregar una señal agonista o antagonista. La naturaleza basada en la afinidad de la señalización mediada por un AcMo, puede tener un impacto en su perfil de efectos secundarios. Por lo tanto, la afinidad deseada y las funciones deseadas de los anticuerpos monoclonales terapéuticos se deben determinar cuidadosamente mediante experimentación *in vitro* e *in vivo*.

vivo.

La Kd deseada de una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo) se puede determinar experimentalmente en función del resultado terapéutico deseado. En una realización, se seleccionan anticuerpos parentales que tienen una afinidad (Kd) hacia un antígeno particular que es igual o mejor que la afinidad deseada de la DVD-Ig hacia el mismo antígeno. La afinidad de la unión al antígeno y la cinética se evalúan mediante Biacore u otra técnica similar. En una realización, cada anticuerpo parental tiene una constante de disociación (Kd) de su antígeno, seleccionada a partir del grupo que consiste en: como máximo aproximadamente  $10^{-7}$  M; como máximo aproximadamente  $10^{-8}$  M; como máximo aproximadamente  $10^{-9}$  M; como máximo aproximadamente  $10^{-10}$  M; como máximo aproximadamente  $10^{-11}$  M; como máximo aproximadamente  $10^{-12}$  M; y como máximo  $10^{-13}$ . El primer anticuerpo parental a partir del cual se obtiene VD1, se obtiene y el segundo anticuerpo parental a partir del cual se obtiene VD2, pueden tener una afinidad similar o diferente ( $K_D$ ) hacia el antígeno respectivo. Cada anticuerpo parental tiene una constante de tasa de asociación (Kon) con el antígeno, seleccionada a partir del grupo que consiste en: al menos aproximadamente  $10^2$   $M^{-1} s^{-1}$ ; al menos aproximadamente  $10^3$   $M^{-1} s^{-1}$ ; al menos aproximadamente  $10^4$   $M^{-1} s^{-1}$ ; al menos aproximadamente  $10^5$   $M^{-1} s^{-1}$ ; y al menos aproximadamente  $10^6$   $M^{-1} s^{-1}$ , tal y como se mide por resonancia de plasmón superficial. El primer anticuerpo parental a partir del cual se obtiene, por ejemplo, VD1 y el segundo anticuerpo parental a partir del cual se obtiene VD2, pueden tener una constante de tasa de asociación (Kon) similar o diferente para el antígeno respectivo. En una realización, cada anticuerpo parental tiene una constante de tasa de disociación (Koff) para el antígeno, seleccionada a partir del grupo que consiste en: como máximo aproximadamente  $10^{-3}$   $s^{-1}$ ; como máximo aproximadamente  $10^{-4}$   $s^{-1}$ ; como máximo aproximadamente  $10^{-5}$   $s^{-1}$ ; y como máximo aproximadamente  $10^{-6}$   $s^{-1}$ , tal y como se mide por resonancia de plasmón superficial. El primer anticuerpo parental a partir del cual se obtiene VD1 y el segundo anticuerpo parental a partir del cual se obtiene VD2, pueden tener constantes de tasa de disociación (Koff) similares o diferentes para el antígeno respectivo.

**B2. Potencia**

La afinidad/potencia deseada de los anticuerpos monoclonales parentales dependerá del resultado terapéutico deseado. Por ejemplo, para las interacciones receptor-ligando (R-L), la afinidad (Kd) es igual o mejor que la kd de R-L (intervalo pM). Para un aclaramiento sencillo de proteínas patológicas circulantes, la Kd podría estar en un intervalo nM bajo, por ejemplo, el aclaramiento de varias especies de péptido A-β circulante. Además, la Kd también dependerá de si la diana expresa múltiples copias del mismo epítipo, por ejemplo, un AcMo dirigido a un epítipo conformacional en oligómeros Aβ.

Cuando VD1 y VD2 se unen al mismo antígeno, pero a epítopos distintos, la DVD-Ig contendrá sitios de unión para el mismo antígeno, lo que aumenta la avidéz y con ello la Kd aparente de la DVD-Ig. En una realización, se eligen anticuerpos parentales con igual o menor Kd que la deseada en la DVD-Ig. Las consideraciones de la afinidad de un AcMo parental también pueden depender de si la DVD-Ig contiene cuatro o más sitios de unión a antígeno idénticos (es decir, una DVD-Ig procedente de un solo AcMo). En este caso, la Kd aparente sería mayor que la del AcMo debido a la avidéz. Tales DVD-Igs se pueden emplear para reticular un receptor de superficie, aumentar la potencia de neutralización, aumentar el aclaramiento de proteínas patológicas, etc.

En otra realización, se seleccionan anticuerpos parentales con potencia de neutralización para el antígeno específico que es igual o mejor que la potencia de neutralización deseada de la DVD-Ig para el mismo antígeno. La potencia de neutralización se puede evaluar con un bioensayo dependiente de la diana, en donde las células de tipo apropiado producen una señal medible (es decir, una proliferación o producción de citocinas) como respuesta a una estimulación de la diana y la neutralización de la diana a través del AcMo puede reducir la señal de una manera dependiente de la dosis.

**B3. Funciones biológicas**

Los anticuerpos monoclonales pueden realizar potencialmente diversas funciones. Algunas de estas funciones se enumeran en la Tabla 5. Estas funciones se pueden determinar mediante ensayos *in vitro* (por ejemplo, ensayos basados en células y bioquímicos) y con modelos animales *in vivo*.

**Tabla 5. Algunas aplicaciones potenciales para anticuerpos terapéuticos**

Diana (Clase)	Mecanismo de Acción (diana)
Soluble (citocinas, otros)	Neutralización de la actividad (por ejemplo, una citocina, tal como IL-1β)
	Aumentar el aclaramiento (por ejemplo, oligómeros Aβ)
	Aumentar la semivida (por ejemplo, GLP 1)
Superficie celular (receptores, otros)	Agonista (por ejemplo, GLP1 R, EPO R, etc.)
	Antagonista (por ejemplo, integrinas, etc.)
	Agentes citotóxicos (CD 20, etc.)

Diana (Clase)	Mecanismo de Acción (diana)
Depósitos de proteínas	Aumentar el aclaramiento/degradación (por ejemplo, placas de A $\beta$ , depósitos de amiloide)

Los AcMos con funciones diferentes que se describen en los ejemplos del presente documento y en la Tabla 5, se pueden seleccionar para lograr resultados terapéuticos deseados. Dos o más anticuerpos monoclonales parentales seleccionados se pueden utilizar entonces en el formato DVD-Ig para lograr dos funciones distintas en una sola molécula DVD-Ig. Por ejemplo, una DVD-Ig se puede generar mediante la selección de un AcMo parental que neutraliza la función de una citocina específica, tal como IL-1 $\beta$  y la selección de un AcMo parental que mejora el aclaramiento de una proteína patológica. Del mismo modo, dos AcMos parentales se pueden seleccionar de modo que reconozcan dos receptores de la superficie celular diferentes, un AcMo con una función agonista sobre un receptor y el otro AcMo con una función antagonista sobre un receptor diferente. Estos dos AcMos seleccionados, cada uno con una función distinta, se pueden utilizar para construir una única molécula DVD-Ig que poseerá las dos funciones distintas (agonista y antagonista) de los anticuerpos monoclonales seleccionados en una sola molécula. Del mismo modo, dos AcMos antagonistas de receptores de la superficie celular, en donde cada uno bloquea la unión de ligandos de receptores respectivos (por ejemplo, EGF e IGF), se pueden utilizar en un formato DVD-Ig. A la inversa, un AcMo antagonista anti-receptor (por ejemplo, anti-EGFR) y un AcMo mediador anti-soluble neutralizante (por ejemplo, anti-IGF1/2) se pueden seleccionar para preparar una DVD-Ig.

#### B4. Reconocimiento de epítomos:

Diferentes regiones de proteínas pueden realizar diferentes funciones. Por ejemplo, regiones específicas de una citocina, como IL-1 $\beta$ , interactúan con el receptor de la citocina para llevar a cabo la activación del receptor, mientras que otras regiones de la proteína pueden ser necesarias para la estabilización de la citocina. En este caso, se puede seleccionar un AcMo que se une específicamente a la o las regiones que interactúan con el receptor sobre la citocina, bloqueando de este modo la interacción citocina-receptor. En algunos casos, por ejemplo, se pueden seleccionar ciertos receptores de quimiocinas que se unen a múltiples ligandos, un AcMo que se une al epítipo (región sobre el receptor de la quimiocina) que interactúa con un único ligando. En otros casos, los anticuerpos monoclonales se pueden unir a epítomos sobre una diana que no es directamente responsable de las funciones fisiológicas de la proteína, pero uniendo un AcMo a estas regiones se podría interferir con las funciones fisiológicas (impedimento estérico) o alterar la conformación de la proteína, de tal manera que la proteína no puede funcionar (AcMo para receptores con múltiples ligandos que altera la conformación del receptor de tal manera que ninguno de los ligandos puede unirse). Los anticuerpos monoclonales anti-citocina que no bloquean la unión de la citocina a su receptor, pero bloquean la transducción de señales, también han sido identificados (por ejemplo, 125-2H, un AcMo anti-IL-18).

Ejemplos de epítomos y funciones de AcMos incluyen, pero no se limitan a, bloquear la interacción receptor-ligando (R-L) (AcMo neutralizante que se une a un sitio que interactúa con el R); impedimento estérico que produce una disminución o falta de unión a R. Un anticuerpo puede unirse a la diana en un sitio que no sea un sitio de unión al receptor, pero todavía interfiere con la unión al receptor y las funciones de la diana mediante la inducción de un cambio conformacional y eliminando la función (por ejemplo, XOLAIR<sup>®</sup> omalizumab, Genetech/Novartis), que se une a R pero bloquea la señalización (AcMo 125-2H).

En una realización, el AcMo parental tiene que dirigirse al epítipo apropiado para tener una eficacia máxima. Tal epítipo debe conservarse en la DVD-Ig. El epítipo de unión de un AcMo se puede determinar por varios métodos, incluyendo la cocrystalografía, la proteólisis limitada de un complejo AcMo-antígeno más el cartografiado de péptidos por espectrometría de masas (Legros et al., Protein Sci., 9: 1002-1010 (2000)), bancos de péptidos presentados en fagos (O'Connor et al., J. Immunol. Methods, 299: 21-35 (2005)), así como mutagénesis (Wu C. et al., J. Immunol., 170: 5571- 5577 (2003)).

#### B5. Propiedades fisicoquímicas y farmacéuticas

El tratamiento terapéutico con anticuerpos requiere frecuentemente la administración de dosis elevadas, frecuentemente varios mg/kg (debido a una baja potencia sobre una base de masa, como consecuencia de un peso molecular normalmente elevado). Con el fin de acomodar el cumplimiento del paciente y abordar adecuadamente las terapias de enfermedades crónicas y tratamiento ambulatorio, la administración subcutánea (s.c.) o intramuscular (i.m.) de AcMos terapéuticos es deseable. Por ejemplo, el volumen máximo deseable para una administración s.c. es aproximadamente de ~1,0 ml y, por lo tanto, concentraciones de >100 mg/ml son deseables para limitar el número de inyecciones por dosis. En una realización, el anticuerpo terapéutico se administra en una dosis. Sin embargo, el desarrollo de tales formulaciones se ve limitado, debido a interacciones proteína-proteína (por ejemplo, agregación que potencialmente aumenta los riesgos de inmunogenicidad) y a limitaciones durante el procesamiento y la entrega (por ejemplo, viscosidad). En consecuencia, las grandes cantidades requeridas para una eficacia clínica y las limitaciones del desarrollo asociadas, limitan una explotación completa del potencial de la formulación de anticuerpo y de una administración s.c. en regímenes de dosis altas. Es evidente que las propiedades fisicoquímicas y farmacéuticas de una molécula de proteína y solución de proteína tienen suma importancia, por ejemplo, la



estabilidad, la solubilidad y la viscosidad.

### B5.1. Estabilidad

Una formulación de anticuerpo "estable" es una en la que el anticuerpo conserva en ella esencialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica durante el almacenamiento. La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada durante un período de tiempo seleccionado. En una realización, el anticuerpo en la formulación es estable a temperatura ambiente (aproximadamente 30°C) o a 40°C durante al menos 1 mes y/o estable a aproximadamente 2-8°C durante al menos 1 año, por ejemplo, durante al menos 2 años. Además, en una realización, la formulación es estable después de una congelación (por ejemplo, a -70°C) y descongelación de la formulación, en lo sucesivo denominadas un "ciclo de congelación/descongelación". En otro ejemplo, una formulación "estable" puede ser una en la que menos de aproximadamente el 10% y menos de aproximadamente el 5% de la proteína está presente en la formulación como un agregado.

Es deseable una DVD-Ig estable *in vitro* a diferentes temperaturas durante un período de tiempo prolongado. Se puede lograr esto mediante un escrutinio rápido de AcMos parentales estables *in vitro* a temperatura elevada, por ejemplo, a 40°C durante 2-4 semanas y luego evaluando la estabilidad. Durante un almacenamiento a 2-8°C, la proteína muestra estabilidad durante al menos 12 meses, por ejemplo, al menos 24 meses. La estabilidad (% de molécula monomérica, intacta) se puede evaluar usando varias técnicas, tales como cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de exclusión por tamaño, SDS-PAGE, así como pruebas de bioactividad. Para una lista más amplia de técnicas analíticas que se pueden emplear para analizar las modificaciones covalentes y conformacionales, véase, Jones, A.J.S., "Analytical methods for the assessment of protein formulations and delivery systems", capítulo 2, En Formulation and delivery of peptides and proteins, 1ª ed., (Cleland y Langer, compiladores) (American Chemical Society, Washington, D.C., 1994) pp. 22-45; y Pearlman y Nguyen, "Analysis of protein drugs", capítulo 6, En Peptide and protein drug delivery, 1ª ed. [En Advances in Parenteral Sciences, vol. 4] (Lee, V.H., compilador) (Marcel Dekker, Inc., New York, 1991) pp. 247-301.

Heterogeneidad y formación de agregados: la estabilidad del anticuerpo puede ser tal que la formulación puede revelar menos de aproximadamente 10% y, en una realización, menos de aproximadamente 5%, en otra realización, menos de aproximadamente 2% o, en una realización, dentro del intervalo de 0,5% a 1,5% o menos en el material de anticuerpo GMP que está presente como agregado. La cromatografía de exclusión por tamaño es un método que es sensible, reproducible y muy resistente en la detección de agregados de proteínas.

Además de los bajos niveles de agregados, el anticuerpo debe ser, en una realización, químicamente estable. La estabilidad química se puede determinar por cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, cromatografía de intercambio catiónica o aniónica), cromatografía de interacción hidrófoba u otros métodos tales como el enfoque isoeléctrico o la electroforesis capilar. Por ejemplo, la estabilidad química del anticuerpo puede ser tal que después de un almacenamiento durante al menos 12 meses a 2-8°C, el pico que representa un anticuerpo no modificado en una cromatografía de intercambio catiónico, no puede aumentar más del 20%, en una realización, no más del 10% o, en otra realización, no más del 5% en comparación con la solución de anticuerpo antes de la prueba de almacenamiento.

En una realización, los anticuerpos parentales muestran integridad estructural; formación de enlaces disulfuro correctos y plegamiento correcto: una inestabilidad química debida a cambios en la estructura secundaria o terciaria de un anticuerpo puede afectar a la actividad del anticuerpo. Por ejemplo, la estabilidad tal como se indica por la actividad del anticuerpo, puede ser tal que después de un almacenamiento durante al menos 12 meses a 2-8°C, la actividad del anticuerpo puede disminuir no más del 50%, en una realización no más del 30% o incluso no más del 10% o, en una realización, no más del 5% o 1%, en comparación con la solución de anticuerpo antes de la prueba de almacenamiento. Ensayos de unión a antígeno adecuados se pueden emplear para determinar la actividad de los anticuerpos.

### B5.2. Solubilidad

La "solubilidad" de un AcMo se correlaciona con la producción de IgG plegada correctamente, monomérica. Por consiguiente, la solubilidad de la IgG se puede evaluar por HPLC. Por ejemplo, una IgG soluble (monomérica) dará lugar a un único pico en el cromatógrafo de HPLC, mientras que una insoluble (por ejemplo, multímera y agregada) dará lugar a una pluralidad de picos. Una persona experta en la técnica será capaz por lo tanto de detectar un aumento o disminución de la solubilidad de una IgG, utilizando técnicas de HPLC de rutina. Para una lista más amplia de técnicas analíticas que se pueden emplear para analizar la solubilidad (véase, Jones, A.G., Dep. Chem. Biochem. Eng., Univ. Coll. London, "Particle formation and separation in suspension crystallization processes", capítulo 4, En Process. Solid-Liquid Suspensions, (P. Ayazi Shamlou, compilador) (Butterworth-Heinemann, Oxford, UK, 1993) pp. 93-117; y Pearlman y Nguyen, "Analysis of protein drugs", capítulo 6, En Peptide and protein drug delivery, 1ª ed. [En Advances in Parenteral Sciences, vol. 4] (Lee, V.H., compilador) (Marcel Dekker, Inc., New York, 1991) pp. 247-301). La solubilidad de un AcMo terapéutico es decisiva para la formulación a concentración elevada, requerida frecuentemente para una dosificación adecuada. Tal y como se indica en el presente documento, solubilidades de >100 mg/ml pueden ser necesarias para acomodar una dosificación eficaz de anticuerpo. Por ejemplo, la solubilidad del anticuerpo puede ser no inferior a aproximadamente 5 mg/ml en una fase de investigación

temprana, en una realización, no inferior a aproximadamente 25 mg/ml en etapas avanzadas del proceso científico, o en una realización, no inferior a aproximadamente 100 mg/ml, o en una realización no inferior a aproximadamente 150 mg/mL. Las propiedades intrínsecas de una molécula de proteína son importantes para las propiedades físico-químicas de la solución de proteína, por ejemplo, estabilidad, solubilidad, viscosidad. Sin embargo, una persona experta en la técnica apreciará que existe una amplia variedad de excipientes que pueden usarse como aditivos para influir beneficiosamente en las características de la formulación final de la proteína. Estos excipientes pueden incluir: (i) disolventes líquidos, codisolventes (por ejemplo, alcoholes tales como etanol); (ii) agentes tamponantes (por ejemplo, tampones fosfato, acetato, citrato, aminoácido); (iii) azúcares o alcoholes de azúcar (por ejemplo, sacarosa, trehalosa, fructosa, rafinosa, manitol, sorbitol, dextranos); (iv) agentes tensioactivos (por ejemplo, polisorbato 20, 40, 60, 80, poloxámeros); (v) modificadores de la isotonicidad (por ejemplo, sales tales como NaCl, azúcares, alcoholes de azúcar); y (vi) otros (por ejemplo, agentes conservantes, quelantes, antioxidantes, sustancias quelantes (por ejemplo, EDTA), polímeros biodegradables, moléculas portadoras (por ejemplo, HSA, PEGs))

La viscosidad es un parámetro de gran importancia con respecto a la fabricación de anticuerpos y el procesamiento de anticuerpos (por ejemplo, la diafiltración/ultrafiltración), procesos de relleno-acabado (aspectos del bombeo, aspectos de la filtración) y aspectos de la entrega (con jeringuilla, de suministro con un dispositivo sofisticado). Las viscosidades bajas permiten que la solución líquida del anticuerpo tenga una concentración más alta. Esto permite que se administre la misma dosis en volúmenes más pequeños. Unos volúmenes de inyección bajos proporcionan la ventaja de menos dolor durante la inyección y las soluciones no necesariamente tienen que ser isotónicas para reducir el dolor de la inyección en el paciente. La viscosidad de la solución de anticuerpo puede ser tal que con tasas de cizallamiento de 100 (1/s), la viscosidad de la solución de anticuerpos es inferior a 200 mPa s, en una realización inferior a 125 mPa s, en otra realización inferior a 70 mPa s y en otra realización más inferior a 25 mPa s o incluso inferior a 10 mPa s.

### B5.3. Producción eficaz

La generación de una DVD-Ig que se expresa de manera eficaz en células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), requerirá en una realización dos anticuerpos monoclonales parentales en donde ellos mismos se expresan de manera eficaz en células de mamífero. El rendimiento de la producción a partir de una línea de mamífero estable (es decir, CHO) debe estar por encima de aproximadamente 0,5 g/L, en una realización por encima de aproximadamente 1 g/L y en otra realización en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 g/L o más (Kipriyanov et al., *Mol. Biotechnol.*, 12: 173-201 (1999); Carroll et al., *Expert Opin Biol Ther.*, 4: 1821-1829 (2004)).

La producción de anticuerpos y de proteínas de fusión de Ig en células de mamífero está influenciada por varios factores. Una modificación genética del vector de expresión a través de la incorporación de promotores fuertes, potenciadores y marcadores de selección puede maximizar la transcripción del gen de interés a partir de una copia del vector integrado. La identificación de sitios de integración de vectores que son permisivos para niveles elevados de transcripción de genes, puede aumentar la expresión de proteínas a partir de un vector (Wurm, F.M., *Nature Biotechnol.*, 22(11): 1393-1398 (2004)). Además, los niveles de producción se ven afectados por la relación de las cadenas pesadas y cadenas ligeras del anticuerpo y diversas etapas en el proceso de ensamblaje y secreción de proteínas (Jiang et al., *Biotechnol. Prog.*, 22 (1): 313-318 (2006)).

### B6. Inmunogenicidad

La administración de un AcMo terapéutico puede producir cierta incidencia de una respuesta inmune (es decir, la formación de anticuerpos endógenos dirigidos contra el AcMo terapéutico). Los elementos potenciales que podrían inducir inmunogenicidad deben ser analizados durante la selección de los anticuerpos monoclonales parentales y se pueden tomar medidas para reducir tal riesgo, para optimizar los anticuerpos monoclonales parentales antes de la construcción de la DVD-Ig. Se ha observado que los anticuerpos obtenidos a partir de ratones son altamente inmunógenos en los pacientes. La generación de anticuerpos quiméricos que constan de regiones variables de ratón y constantes humanas presenta una siguiente etapa lógica para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos terapéuticos (Morrison y Schlom, "Recombinant Chimeric Monoclonal Antibodies", capítulo 1, *En Important Advances in Oncology 1990* (J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1990) pp. 3-18). Alternativamente, la inmunogenicidad se puede reducir mediante la transferencia de secuencias de CDRs murinas a una región estructural de anticuerpo humano (remodelación/injerto de CDR/humanización), como describe para un anticuerpo terapéutico Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988). En otro método que se conoce como "revestimiento" o "recubrimiento", partiendo de los dominios pesados y ligeros variables de roedor, solo se alteran a humanos los aminoácidos de la región estructural que están accesibles en la superficie, mientras que las CDRs y los aminoácidos enterrados se conservan del anticuerpo de roedor parental (Roguska et al., *Protein Eng.*, 9(10): 895-904 (1996)). En otro tipo de humanización, en lugar de injertar las CDRs completas, una técnica injerta solo las "regiones determinantes de la especificidad" (SDRs), definidas como el subconjunto de residuos de CDRs que están implicados en la unión del anticuerpo a su diana (Kashmiri et al., *Methods*, 36(1): 25-34 (2005)). Esto requiere la identificación de las SDRs ya sea a través de un análisis de las estructuras tridimensionales disponibles de los complejos anticuerpo-diana o un análisis mutacional de los residuos de CDRs de anticuerpos para determinar cuál de ellos interacciona con la diana. Alternativamente, los anticuerpos completamente humanos pueden tener una inmunogenicidad reducida en comparación con anticuerpos murinos, quiméricos o humanizados.

Otro enfoque para reducir la inmunogenicidad de anticuerpos terapéuticos es la eliminación de ciertas secuencias específicas que se predicen que van a ser inmunogénicas. En un enfoque, después de una primera generación, agentes biológicos se han sometido a ensayo en seres humanos y se ha encontrado que son inaceptablemente inmunógenos, los epítomos de linfocitos B se pueden cartografiar y luego alterar para evitar una detección inmune.

5 Otro enfoque utiliza métodos para predecir y eliminar posibles epítomos de linfocitos T. Se han desarrollado métodos informáticos para escanear e identificar las secuencias de péptidos de agentes terapéuticos biológicos con el potencial para unirse a proteínas del MHC (Desmet et al., *Proteins*, 58: 53-69 (2005)). Alternativamente, un método basado en células dendríticas humanas se puede usar para identificar epítomos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en alérgenos proteicos potenciales (Stickler et al., *J. Immunother.*, 23: 654-660 (2000); Morrison y Schlom, *Important Adv. Oncol.* (1990) pp. 3-18; Riechmann et al. "Reshaping human antibodies for therapy", *Nature*. 332: 323-327 (1988); Roguska et al., "A comparison of two murine mAbs humanized by CDR-grafting and variable domain resurfacing", *Protein Eng.*, 9: 895-904 (1996); Kashmiri et al., "SDR grafting - a new approach to antibody humanization", *Methods*, 36(1): 25-34 (2005); Desmet et al., "Anchor profiles of HLA-specific peptides: analysis by a novel affinity scoring method and experimental validation", *Proteins*, 58: 53-69 (2005); Stickler et al., "CD4<sup>+</sup> T-cell epitope determination using unexposed human donor peripheral blood mononuclear cells", *J. Immunother.*, 23: 654-660 (2000)).

### B7. Eficacia *in vivo*

Para generar una molécula DVD-Ig con una eficacia *in vivo* deseada, es importante generar y seleccionar AcMos con una eficacia *in vivo* deseada similar, cuando se administran en combinación. Sin embargo, en algunos casos, la DVD-Ig puede mostrar una eficacia *in vivo* que no se puede alcanzar con la combinación de dos AcMos distintos. Por ejemplo, una DVD-Ig puede aportar dos dianas muy próximas lo que conduce a una actividad que no se puede lograr con la combinación de dos AcMos distintos. Funciones biológicas deseables adicionales se describen en el presente documento en la sección B3. Anticuerpos parentales con características deseables en la molécula DVD-Ig, se pueden seleccionar basándose en factores tales como la semivida farmacocinética ( $t_{1/2}$ ); la distribución en los tejidos; dianas solubles frente a las de la superficie celular; y la densidad de concentración de diana soluble/superficie.

### B8. Distribución tisular *in vivo*

Para generar una molécula DVD-Ig con la distribución tisular *in vivo* deseada, en una realización, se deben seleccionar AcMos parentales con un perfil de distribución tisular *in vivo* deseada similar. Alternativamente, basándose en el mecanismo de la estrategia de dirigirse a dianas con doble especificidad, en otros momentos puede no ser necesario seleccionar AcMos parentales con la misma distribución tisular *in vivo* deseada cuando se administran en combinación. Por ejemplo, en el caso de una DVD-Ig en la que un componente de la unión se dirige a la DVD-Ig en un sitio específico, con lo que el segundo componente de la unión se dirige a la misma diana. Por ejemplo, una especificidad de unión de una DVD-Ig podría dirigirse al páncreas (células de los islotes) y la otra especificidad podría llevar GLP1 al páncreas para inducir la insulina.

### B9. Isotipo

Para generar una molécula DVD-Ig con las propiedades deseadas, incluyendo, pero no limitadas a, isotipo, funciones efectoras y semivida en circulación, los AcMos parentales se seleccionan de modo que poseen funciones efectoras de Fc apropiadas, dependiendo de la utilidad terapéutica y del criterio de valoración terapéutico deseado. Hay cinco clases o isotipos principales de cadena pesada, algunos de los cuales tienen varios subtipos y estos determinan las funciones efectoras de una molécula de anticuerpo. Estas funciones efectoras residen en la región bisagra, dominios CH2 y CH3 de la molécula de anticuerpo. Sin embargo, los residuos en otras partes de una molécula de anticuerpo pueden tener también efectos sobre las funciones efectoras. Las funciones efectoras de Fc de la región bisagra incluyen: (i) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), (ii) unión al complemento (C1q), activación y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), (iii) fagocitosis/aclaramiento de complejos antígeno-anticuerpo y (iv) liberación de citocinas en algunos casos. Estas funciones efectoras de Fc de una molécula de anticuerpo están mediadas a través de la interacción de la región Fc con un conjunto de receptores de la superficie celular específicos de la clase. Los anticuerpos del isotipo IgG1 son más activos, mientras que IgG2 e IgG4 tienen funciones mínimas o no efectoras. Las funciones efectoras de los anticuerpos IgG están mediadas a través de interacciones con tres tipos estructuralmente homólogos de receptores de Fc celular (y subtipos) (FcγR1, FcγRII y FcγRIII). Estas funciones efectoras de una IgG1 pueden ser eliminadas mediante la mutación de residuos de aminoácidos específicos en la región bisagra inferior (por ejemplo, L234A, L235A) que se requieren para la unión a FcγR y a C1q. Residuos de aminoácidos en la región Fc, en particular, los dominios CH2-CH3, también determinan la semivida en circulación de la molécula de anticuerpo. Esta función de Fc está mediada por la unión de la región Fc al receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable del reciclado de moléculas de anticuerpo a partir de los lisosomas ácidos, de vuelta a la circulación general.

El que un AcMo pueda tener un isotipo activo o inactivo dependerá del criterio de valoración terapéutico deseado para un anticuerpo. Algunos ejemplos del uso de isotipos y el resultado terapéutico deseado, se enumeran a continuación:

1. Si el criterio de valoración deseado es una neutralización funcional de una citocina soluble, entonces se

puede emplear un isotipo inactivo;

2. Si el resultado deseado es el aclaramiento de una proteína patológica, se puede emplear un isotipo activo;

3. Si el resultado deseado es el aclaramiento de agregados de proteínas, se puede emplear un isotipo activo;

5 4. Si el resultado deseado es antagonizar un receptor de la superficie, se emplea un isotipo inactivo (Tysabri, IgG4; OKT3<sup>®</sup>, IgG1 mutada);

5. Si el resultado deseado es eliminar células diana, se emplea un isotipo activo (Herceptina, IgG1 (y con funciones efectoras mejoradas); y

6. Si el resultado deseado es aclarar proteínas de la circulación sin que entren en el SNC, se puede emplear un isotipo IgM (por ejemplo, especies peptídicas de Ac circulantes para el aclaramiento).

10 Las funciones efectoras de Fc de un AcMo parental se pueden determinar por diversos métodos *in vitro* bien conocidos en la técnica.

15 Como se ha descrito, la selección del isotipo y por lo tanto las funciones efectoras, dependerá del criterio de valoración terapéutico deseado. En los casos en los que se desea una neutralización simple de una diana circulante, por ejemplo, para bloquear las interacciones receptor-ligando, pueden no ser necesarias las funciones efectoras. En tales casos, los isotipos o mutaciones en la región Fc de un anticuerpo que eliminan las funciones efectoras son deseables. En otros casos en los que la eliminación de células diana es el criterio de valoración terapéutico, por ejemplo, la eliminación de células, isotipos o mutaciones tumorales o una defucosilación en la región Fc que mejora las funciones efectoras son deseables (Presta, L.G., *Adv. Drug Del. Rev.*, 58: 640-656 (2006); Satoh et al., *Expert Opin. Biol. Ther.*, 6: 1161-1173 (2006). Del mismo modo, dependiendo de la utilidad terapéutica, la semivida en circulación de una molécula de anticuerpo se puede reducir/prolongar mediante la modulación de las interacciones anticuerpo-FcRn mediante la introducción de mutaciones específicas en la región Fc (Dall'Acqua et al., *J. Biol. Chem.*, 281: 23514-23524 (2006); Petkova et al., *Int. Immunol.*, 18: 1759-1769 (2006); Vaccaro et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 18709-18714 (2006).

25 La información publicada sobre los diversos residuos que influyen en las diferentes funciones efectoras de un AcMo terapéutico normal, puede ser que se tenga que confirmar para una DVD-Ig. Es posible que en un formato de DVD-Ig, sean importantes residuos de la región Fc adicionales (diferentes), distintos de los identificados para la modulación de las funciones efectoras de anticuerpos monoclonales.

30 En general, la decisión en cuanto a qué funciones efectoras de Fc (isotipo) serán decisivas en el formato final de DVD-Ig, dependerá de la indicación de la enfermedad, la diana terapéutica, el criterio de valoración terapéutico deseado y consideraciones de seguridad. A continuación se enumeran a modo de ejemplo regiones constantes adecuadas de la cadena pesada y de la cadena ligera, incluyendo, pero no limitadas a: IgG1 - alotipo: G1mz; IgG1 mutante - A234, A235; IgG2 - alotipo: G2m(n-); Kappa - Km3; y Lambda.

35 **Estudios de receptor de Fc y C1q:** La posibilidad de una citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) no deseada y de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mediante la formación de complejos de anticuerpos, para cualquier diana hiperexpresada sobre las membranas celulares, se puede evitar mediante mutaciones en la región bisagra (por ejemplo, L234A, L235A). Estos aminoácidos sustituidos, presentes en la región bisagra de IgG1 de un AcMo, se espera que den como resultado una disminución de la unión del AcMo a receptores de Fc humano (pero no de FcRn), ya que la unión a FcγR se piensa que tiene lugar dentro de sitios de solapamiento en la región bisagra de IgG1. Esta característica del AcMo puede conducir a un perfil de seguridad mejorado frente a los anticuerpos que contienen una IgG de tipo silvestre. La unión del AcMo a los receptores de Fc humano se puede determinar mediante experimentos de citometría de flujo, utilizando líneas celulares (por ejemplo, THP-1, K562) y una línea celular CHO modificada genéticamente que expresa FcγRIIb (u otros FcγRs). En comparación con anticuerpos monoclonales de control de IgG1, el AcMo muestra una unión reducida a FcγRI y FcγRIIa, mientras que la unión a FcγRIIb no se ve afectada. La unión y la activación de C1q a través de complejos inmunes antígeno/IgG desencadena la cascada clásica del complemento con las consiguientes respuestas inflamatorias y/o inmunorreguladoras. El sitio de unión a C1q sobre las IgGs se ha localizado en residuos dentro de la región bisagra de IgG. La unión a C1q con concentraciones crecientes de AcMo, se evaluó mediante ELISA de C1q. Los resultados demuestran que el AcMo es incapaz de unirse a C1q, como se esperaba cuando se comparaba con la unión de una IgG1 de control de tipo silvestre. En general, la mutación de la región bisagra L234A, L235A suprime la unión del AcMo a FcγRI, FcγRIIa y C1q, pero no afecta a la interacción del AcMo con FcγRIIb. Estos datos sugieren que el AcMo *in vivo* con Fc mutante va a interaccionar normalmente con el FcγRIIb inhibidor, pero probablemente fallará en la interacción con los receptores activantes FcγRI y FcγRIIa o C1q.

55 **Unión a FcRn humano:** El receptor neonatal (FcRn) es responsable del transporte de la IgG a través de la placenta y de controlar la semivida catabólica de las moléculas de IgG. Podría ser deseable incrementar la semivida terminal de un anticuerpo para mejorar la eficacia, reducir la dosis o la frecuencia de la administración o para mejorar la localización de la diana. Alternativamente, podría ser ventajoso hacer a la inversa, es decir, disminuir la semivida terminal de un anticuerpo para reducir toda la exposición corporal o para mejorar las tasas de unión diana a no

diana. La adaptación de la interacción entre IgG y su receptor de tipo silvestre, FcRn, ofrece una manera de aumentar o disminuir la semivida terminal de IgG. Las proteínas en la circulación, incluyendo IgG, se recogen en la fase de fluido a través de micropinocitosis mediante ciertas células, tales como las del endotelio vascular. La IgG puede unirse a FcRn en los endosomas en condiciones ligeramente ácidas (pH 6,0-6,5) y se puede reciclar a la superficie celular, en donde se libera en condiciones casi neutras (pH 7,0-7,4). El cartografiado del sitio de unión a la región Fc en FcRn80, 16, 17, mostraba que dos residuos de histidina que están conservados en todas las especies, His310 y His435, son responsables de la dependencia del pH en esta interacción. Utilizando la tecnología de presentación en fagos, se identificó una mutación de la región Fc de ratón que aumenta la unión a FcRn y extiende la semivida de la IgG de ratón (véase, Ghetie et al., *Nature Biotechnol.*, 15(7): 637-640 (1997)). Mutaciones en la región Fc que aumentan la afinidad de la unión de la IgG humana hacia FcRn a pH 6,0, pero no a pH 7,4, también han sido identificadas (véase, Dall'Acqua y col, *J. Immunol.*, 169(9): 5171- 5180 (2002)). Por otra parte, en un caso, un aumento similar de la unión dependiente del pH (hasta 27 veces) también se observó para FcRn de mono Rhesus y esto daba como resultado un incremento de dos veces de la semivida en suero en monos Rhesus, en comparación con la IgG parental (véase, Hinton et al., *J. Biol. Chem.*, 279(8): 6213-6216 (2004)). Estos hallazgos indican que es factible extender la semivida en plasma de anticuerpos terapéuticos mediante la adaptación de la interacción de la región Fc con el FcRn. A la inversa, mutaciones en la región Fc que atenúan la interacción con FcRn, pueden reducir la semivida del anticuerpo.

#### B.10. Farmacocinética (PK)

Para generar una molécula DVD-Ig con el perfil farmacocinético deseado, en una realización, se seleccionan AcMos parentales con el perfil farmacocinético deseado de manera similar. Una consideración es que la respuesta inmunogénica frente a los anticuerpos monoclonales (es decir, "HAHA", respuesta de anticuerpos humanos anti-humanos; "HACA", respuesta de anticuerpos humanos anti-quiméricos) complica aún más la farmacocinética de estos agentes terapéuticos. En una realización, los anticuerpos monoclonales con una inmunogenicidad mínima o ninguna inmunogenicidad se utilizan para construir moléculas DVD-Ig, de modo que las DVD-Igs resultantes también tendrán una inmunogenicidad mínima o ninguna. Algunos de los factores que determinan la PK de un AcMo incluyen, pero no se limitan a, las propiedades intrínsecas del AcMo (secuencia de aminoácidos de VH); la inmunogenicidad; la unión a FcRn y las funciones de Fc.

El perfil PK de los anticuerpos monoclonales parentales seleccionados se puede determinar fácilmente en roedores, ya que el perfil PK en roedores se correlaciona bien con (o predice exactamente) el perfil PK de los anticuerpos monoclonales en mono cynomolgus y seres humanos.

Después de seleccionar los anticuerpos monoclonales parentales con características PK deseadas (y otras propiedades funcionales deseadas como se describen en esta memoria), se construye la DVD-Ig. Como las moléculas DVD-Ig contienen dos dominios de unión al antígeno procedentes de dos anticuerpos monoclonales parentales, las propiedades PK de la DVD-Ig se evalúan también. Por lo tanto, mientras que se determinan las propiedades PK de la DVD-Ig, se pueden emplear ensayos PK que determinan el perfil PK basado en la funcionalidad de ambos dominios de unión a antígeno obtenidos a partir de los 2 anticuerpos monoclonales parentales. El perfil PK de una DVD-Ig se puede determinar. Los factores adicionales que pueden afectar al perfil PK de una DVD-Ig incluyen la orientación del dominio de unión al antígeno (CDR), el tamaño del enlazador y las interacciones Fc/FcRn. Las características PK de los anticuerpos parentales se pueden determinar mediante la evaluación de los siguientes parámetros: absorción, distribución, metabolismo y excreción.

**Absorción:** Hasta la fecha, la administración de anticuerpos monoclonales terapéuticos es a través de vías parenterales (por ejemplo, intravenosa [IV], subcutánea [SC] o intramuscular [IM]). La absorción de un AcMo en la circulación sistémica después de una administración por vía SC o IM desde el espacio intersticial, es principalmente a través de la vía linfática. Una degradación saturable, presistémica, proteolítica puede dar lugar a una biodisponibilidad absoluta variable después de la administración extravascular. Por lo general, se puede observar un aumento de la biodisponibilidad absoluta con dosis crecientes de anticuerpos monoclonales, debido a la capacidad proteolítica saturada con dosis más altas. El proceso de absorción para un AcMo suele ser bastante lento ya que el fluido linfático es drenado lentamente en el sistema vascular y la duración de la absorción puede tener lugar durante horas a varios días. La biodisponibilidad absoluta de anticuerpos monoclonales después de una administración SC, en general varía del 50% al 100%. En el caso de una estructura que media en el transporte a través de la barrera hematoencefálica (BBB) a la que se dirige la estructura artificial de la DVD-Ig, los tiempos de circulación en plasma se pueden reducir debido a un transporte transcelular mejorado en la barrera hematoencefálica (BBB) hasta el compartimento del SNC, en donde se libera la DVD-Ig para permitir la interacción a través de su segundo sitio de reconocimiento de antígeno.

**Distribución:** Después de una administración IV, los anticuerpos monoclonales generalmente siguen un perfil bifásico de concentración-tiempo en el suero (o plasma), empezando con una fase de distribución rápida, seguida por una fase de eliminación lenta. En general, un modelo farmacocinético biexponencial describe mejor este tipo de perfil farmacocinético. El volumen de distribución en el compartimento central (Vc) para un AcMo es generalmente igual o ligeramente mayor que el volumen de plasma (2-3 litros). Un patrón bifásico distinto en la concentración de suero (plasma) frente al perfil del tiempo puede no ser evidente con otras rutas parenterales de administración, tales como IM o SC, porque la fase de distribución de la curva de concentración-tiempo del suero (plasma) está

enmascarada por la larga porción de absorción. Muchos factores, incluyendo las propiedades físicoquímicas, la captación específica de sitio y mediada por receptor, orientada a la diana, la capacidad de unión del tejido y la dosis de AcMo pueden influir en la biodistribución de un AcMo. Algunos de estos factores pueden contribuir a la no linealidad en la biodistribución de un AcMo.

- 5 **Metabolismo y excreción:** Debido al tamaño molecular, los anticuerpos monoclonales intactos no son excretados en la orina a través de los riñones. Se inactivan principalmente por el metabolismo (por ejemplo, catabolismo). Para los anticuerpos monoclonales terapéuticos basados en IgG, las semividas suelen oscilar entre horas o 1-2 días, hasta más de 20 días. La eliminación de un AcMo puede verse afectada por muchos factores, incluyendo, pero no limitados a, afinidad hacia el receptor FcRn, inmunogenicidad del AcMo, grado de glicosilación del AcMo, susceptibilidad del AcMo para la proteólisis y eliminación mediada por el receptor.

10 **B.11. Patrón de reactividad cruzada tisular en especies humanas y tox**

Un patrón de tinción idéntico sugiere que la toxicidad potencial en humanos se puede evaluar en especies tox. Especies tox son aquellos animales en los que se estudia una toxicidad no relacionada.

- 15 Los anticuerpos individuales se seleccionan para satisfacer dos criterios: (1) una tinción de tejidos apropiada para la expresión conocida de la diana del anticuerpo y (2) un patrón de tinción similar entre tejidos de la especie humana y tox procedentes del mismo órgano.

20 Criterio 1: Las inmunizaciones y/o las selecciones de anticuerpos emplean generalmente antígenos recombinantes o sintetizados (proteínas, hidratos de carbono u otras moléculas). La unión al homólogo natural y un escrutinio inverso frente a antígenos no relacionados, son frecuentemente parte del embudo de escrutinio para los anticuerpos terapéuticos. Sin embargo, el escrutinio frente a una multitud de antígenos es frecuentemente poco práctico. Por lo tanto, estudios de reactividad cruzada tisular con tejidos humanos de todos los órganos principales, sirven para descartar una unión no deseada del anticuerpo con cualquier antígeno no relacionado.

25 Criterio 2: Estudios comparativos de reactividad cruzada tisular con tejidos de especie humana y tox (mono cynomolgus, perro, posiblemente roedores y otros, en donde los mismos 36 o 37 tejidos se someten a ensayo como en el estudio humano) ayudan a validar la selección de una especie tox. En los estudios de reactividad cruzada tisular típicos sobre secciones de tejido congelado, los anticuerpos terapéuticos pueden demostrar la unión esperada con el antígeno conocido y/o a una unión de menor grado a tejidos basándose en interacciones de bajo nivel (unión inespecífica, bajo nivel de unión a antígenos similares, bajo nivel de interacciones basadas en la carga, etc.). En cualquier caso, la especie animal tox más relevante es la que tiene el grado más alto de coincidencia de unión a tejido humano y animal.

30 Los estudios de reactividad cruzada tisular siguen las directrices reguladoras apropiadas, incluyendo la directriz EC CPMP III/5271/94 "Production and quality control of mAbs" and the 1997 US FDA/CBER "Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use". Las criosecciones (5 µm) de tejidos humanos obtenidos en una autopsia o biopsia se fijaron y se secaron sobre el portaobjetos de vidrio. La tinción con peroxidasa de secciones de tejido se llevan a cabo utilizando el sistema de avidina-biotina. Orientación de la FDA "Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use". Unas referencias relevantes incluyen Clarke, J. (2004), Boon, L. (2002a), Boon, L. (2002b), Ryan, A. (1999).

35 Los estudios de reactividad cruzada tisular se realizan frecuentemente en dos etapas, en donde la primera etapa incluye criosecciones de 32 tejidos (normalmente: glándula adrenal, tracto gastrointestinal, próstata, vejiga, corazón, músculo esquelético, células sanguíneas, riñón, piel, médula ósea, hígado, médula espinal, mama, pulmón, bazo, cerebelo, ganglios linfáticos, testículos, corteza cerebral, ovario, timo, colon, páncreas, tiroides, endotelio, paratiroides, uréter, ojos, pituitaria, útero, trompas de Falopio y placenta) procedentes de un donante humano. En la segunda fase, se realiza un estudio completo de reactividad cruzada con un máximo de 38 tejidos (incluyendo glándula adrenal, sangre, vasos sanguíneos, médula ósea, cerebelo, cerebro, cuello del útero, esófago, ojo, corazón, riñón, intestino grueso, hígado, pulmón, ganglios linfáticos, glándula mamaria, ovario, oviducto, páncreas, paratiroides, nervio periférico, pituitaria, placenta, próstata, glándula salivar, piel, intestino delgado, médula espinal, bazo, estómago, músculo estriado, testículo, timo, tiroides, amígdalas, uréter, vejiga urinaria y útero) procedentes de tres adultos no relacionados. Los estudios se realizan normalmente como mínimo con dos niveles de dosis.

40 El anticuerpo terapéutico (es decir, el artículo del ensayo) y el anticuerpo de control emparejado por el isotipo pueden estar biotinilados para la detección del complejo avidina-biotina (ABC); otros métodos de detección pueden incluir la detección de un anticuerpo terciario para un artículo del ensayo marcado con FICT (o de otro modo), o la formación de un precomplejo con una IgG anti-humana marcada para un artículo del ensayo no marcado.

45 Brevemente, las criosecciones (aproximadamente 5 µm) de tejidos humanos obtenidos en una autopsia o biopsia se fijan y se secan sobre un portaobjetos de vidrio. La tinción con peroxidasa de secciones de tejido se realiza utilizando el sistema de avidina-biotina. En primer lugar (en el caso de un sistema de detección de un precomplejo), se incuba el artículo del ensayo con IgG anti-humana biotinilada secundaria y se convierte en un complejo inmune. El complejo inmune con concentraciones finales de 2 y 10 µg/ml del artículo del ensayo, se añade a secciones de tejido sobre el portaobjetos de vidrio y luego las secciones de tejido reaccionan durante 30 minutos con un kit de

avidina-biotina-peroxidasa. Posteriormente, se aplica DAB (3,3'-diaminobenzidina), un sustrato para la reacción de la peroxidasa, durante 4 minutos para la tinción del tejido. Perlas de antígeno-sefarosa se usan como secciones de tejido de control positivo.

5 Cualquier tinción específica se juzga o bien como una reactividad esperada (por ejemplo, compatible con la expresión del antígeno) o inesperada basándose en una expresión conocida del antígeno diana en cuestión. Cualquier tinción que se juzga específica se puntúa según la intensidad y la frecuencia. Estudios de competencia del antígeno o el suero o de bloqueo pueden ayudar adicionalmente a determinar si la tinción observada es específica o no específica.

10 Si se encuentra que dos anticuerpos seleccionados satisfacen los criterios de selección - tinción tisular apropiada, tinción compatible entre el tejido específico humano y el animal tox - se pueden seleccionar para la generación de DVD-Ig.

15 El estudio de reactividad cruzada tisular tiene que repetirse con la estructura artificial final de DVD-Ig, pero ya que estos estudios siguen el mismo protocolo que se ha descrito en el presente documento, son más complejos de evaluar debido a que cualquier unión puede proceder de cualquiera de los dos anticuerpos parentales y cualquier unión no explicada se tiene que confirmar con estudios de competencia de antígenos complejos.

Es claramente evidente que el complejo que experimenta estudios de reactividad cruzada tisular con una molécula multiespecífica, tal como una DVD-Ig, se simplifica en gran medida si los dos anticuerpos parentales se seleccionan por: (1) la falta de hallazgos inesperados de reactividad cruzada tisular y (2) la similitud apropiada de hallazgos de reactividad cruzada tisular entre los correspondientes tejidos de la especie humana y animal tox.

## 20 **B.12. Especificidad y selectividad**

Para generar una molécula DVD-Ig con especificidad y selectividad deseadas, hay que generar y seleccionar AcMos parentales con el perfil de especificidad y selectividad deseado de manera similar.

25 Los estudios de unión para la especificidad y la selectividad con una DVD-Ig pueden ser complejos debido a los cuatro o más sitios de unión, dos para cada antígeno. En resumen, los estudios de unión que emplean ELISA, BIAcore, KinExA u otros estudios de interacción con una DVD-Ig, tienen que controlar la unión de uno, dos o más antígenos a la molécula DVD-Ig. Si bien la tecnología BIAcore puede resolver la unión secuencial independiente de múltiples antígenos, los métodos más tradicionales que incluyen ELISA o técnicas más modernas como KinExA, no pueden. Por lo tanto, una caracterización cuidadosa de cada anticuerpo parental es decisiva. Después de caracterizar cada anticuerpo individual para la especificidad, una confirmación de la conservación de la especificidad de los sitios de unión individuales en la molécula DVD-Ig se simplifica en gran medida.

30 Es claramente evidente que la tarea compleja de determinar la especificidad de una DVD-Ig se simplifica en gran medida si los dos anticuerpos parentales se seleccionan según la especificidad antes de combinarlos en una DVD-Ig.

35 Los estudios de interacción antígeno-anticuerpo pueden tener muchas formas, incluyendo muchos estudios de interacción proteína-proteína clásicos, incluyendo ELISA (ensayo inmunoenzimático ligado a enzima), espectrometría de masas, reticulación química, SEC con dispersión de la luz, diálisis de equilibrio, permeación en gel, ultrafiltración, cromatografía en gel, SEC analítica de zona grande, ultracentrifugación micropreparativa (equilibrio de sedimentación), métodos espectroscópicos, microcalorimetría de titulación, equilibrio de sedimentación (en ultracentrífuga analítica), velocidad de sedimentación (en centrífuga analítica), resonancia de plasmón superficial (incluyendo BIAcore). Las referencias relevantes incluyen Current Protocols in Protein Science, volumen 3, capítulos 19 y 20, (Coligan et al., compiladores) (John Wiley & Sons Inc.) y las referencias incluidas en las mismas; y Current Protocols in Immunology, (Coligan et al., compiladores) (John Wiley & Sons Inc.) y las referencias pertinentes incluidas en la misma.

45 **Liberación de citocinas en sangre completa:** La interacción de un AcMo con células de la sangre humana se puede investigar con un ensayo de liberación de citocinas (Wing et al., Therapeutic Immunol., 2(4): 183-190 (1995); Current Protocols in Pharmacology, (Enna et al., compiladores) (John Wiley & Sons Inc.); Madhusudan et al., Clin. Cancer Res., 10(19): 6528-6534 (2004); Cox et al., Methods, 38(4): 274-282 (2006); Choi et al., Eur. J. Immunol., 31(1): 94-106 (2001)). Brevemente, diversas concentraciones de AcMo se incuban con sangre humana completa durante 24 horas. La concentración de la prueba debe cubrir una amplia gama incluyendo concentraciones finales que imitan los niveles en sangre típicos en los pacientes (incluyendo pero no limitados a 100 ng/ml - 100 µg/ml). Después de la incubación, el material sobrenadante y los lisados celulares se analizan para estudiar la presencia de IL-1R $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-1b, IL-6 e IL-8. Los perfiles de concentración de citocinas generadas con el AcMo se comparan con los perfiles producidos para un control negativo de IgG humana y un control positivo de LPS o PHA. El perfil de citocinas mostrado por el AcMo a partir del material sobrenadante de las células y los lisados celulares se compara empleando IgG humana de control. En una realización, el anticuerpo monoclonal no interacciona con las células de sangre humana para liberar espontáneamente citocinas inflamatorias.

Los estudios de liberación de citocinas con una DVD-Ig son complejos debido a los cuatro o más sitios de unión, dos

para cada antígeno. En resumen, los estudios de liberación de citocinas como se describen en el presente documento miden el efecto de la molécula DVD-Ig completa sobre sistemas celulares de la sangre completa o en otros, pero no puede indicar qué parte de la molécula provoca la liberación de citocinas. Una vez que la liberación de citocinas se ha detectado, la pureza de la preparación de DVD-Ig tiene que ser comprobada, debido a que algunos componentes celulares de la copurificación pueden causar una liberación de citocinas por su propia cuenta. Si la pureza no es la cuestión, una fragmentación de la DVD-Ig (incluyendo, pero no limitada a la eliminación de la porción Fc, la separación de los sitios de unión, etc.), una mutagénesis de los sitios de unión u otros métodos puede que sean necesarios para desconvolucionar cualquier observación. Es claramente evidente que esta tarea compleja se simplifica en gran medida si los dos anticuerpos parentales se seleccionan por la falta de liberación de citocinas *antes de ser combinados* en una DVD-Ig.

### B.13. Reactividad cruzada con otras especies para estudios toxicológicos

En una realización, los anticuerpos individuales se seleccionan con suficiente reactividad cruzada para especies tox apropiadas, por ejemplo, mono cynomolgus. Los anticuerpos parentales necesitan unirse a una diana de especie ortóloga (es decir, mono cynomolgus) y provocar una respuesta apropiada (modulación, neutralización, activación). En una realización, la reactividad cruzada (afinidad/potencia) frente a una diana de especie ortóloga debe estar dentro de 10 veces la de la diana humana. En la práctica, los anticuerpos parentales son evaluados para múltiples especies, incluyendo ratón, rata, perro, mono (y otros primates no humanos), así como especies que son modelo de enfermedad (es decir, ovejas para el modelo de asma). La reactividad cruzada aceptable con especies tox de los anticuerpos monoclonales parentales, permite estudios toxicológicos futuros de DVD-Ig en la misma especie. Por esa razón, los dos anticuerpos monoclonales parentales deben tener una reactividad cruzada aceptable para una especie tox común, permitiendo de ese modo estudios de toxicología de DVD-Ig en la misma especie.

Los AcMos parentales se pueden seleccionar a partir de diversos AcMos capaces de unirse a dianas específicas y bien conocidos en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a IL-1 $\beta$ , anticuerpo anti-TNF (documento de patente de EE.UU. n° 6.258.562), anticuerpo anti-IL-12 y/o anti-IL-12p40 (documento de patente de EE.UU. n° 6.914.128); anticuerpo anti-IL-18 (documento de Publicación de EE.UU. n° 2005/0147610 A1), anti-C5, anti-CBL, anti-CD147, anti-gp120, anti-VLA-4, anti-CD11a, anti-CD18, anti-VEGF, anti-CD40L, anti-CD-40 (por ejemplo, véase, el documento de publicación PCT n° WO 2007/124299), anti-Id, anti-ICAM-1, anti-CXCL13, anti-CD2, anti-EGFR, anti-TGF-beta 2, anti-HGF, anti-c-Met, anti-DLL-4, anti-NPR1, anti-PLGF, anti-ErbB3, anti-E-selectina, anti-Fact VII, anti-Her2/neu, anti-F gp, anti-CD11/18, anti-CD14, anti-ICAM-3, anti-RON, anti-CD-19, anti-CD80 (por ejemplo, véase, el documento de publicación PCT n° WO 2003/039486), anti-CD4, anti-CD3, anti-CD23, anti-beta2-integrina, anti-alfa4beta7, anti-CD52, anti-HLA DR, anti-CD22 (véase, por ejemplo, el documento de Patente de EE.UU. n° 5.789.554), anti-CD20, anti-MIF, anti-CD64 (FcR), anti-TCR alfa beta, anti-CD2, anti-Hep B, anti-CA 125, anti-EpCAM, anti-gp120, anti-CMV, anti-gp130, anti-IgE, anti-CD25, anti-CD33, anti-HLA, anti-IGF1,2, anti-IGFR, anti-VNRIintegrina, anti-IL-1 alfa, anti-IL-1 beta, anti-receptor de IL-1, anti-receptor de IL-2, anti-IL-4, anti-receptor de IL-4, anti-IL5, anti-receptor de IL5, anti-IL-6, anti-IL-6R, RANKL, NGF, DKK, alfa/beta3, anti-IL-8, anti-IL-9, anti-IL-13, anti-receptor de IL-13 y anti-IL-23; IL-23p19; (véase, Presta, L.G., "Selection, design, and engineering of therapeutic antibodies", J. Allergy Clin. Immunol., 116: 731-736 (2005) y en el sitio de la red mundial <http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/antibodies.html>).

Los AcMos parentales también se pueden seleccionar a partir de diversos anticuerpos terapéuticos aprobados para el uso, en ensayos clínicos o en desarrollo para uso clínico. Tales anticuerpos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, rituximab (Rituxan<sup>®</sup>, IDEC/Genentech/Roche) (véase, por ejemplo documento de patente EE.UU. n° 5.736.137), un anticuerpo quimérico anti-CD20 aprobado para tratar el linfoma no Hodgkin; HuMax-CD20, un anticuerpo anti-CD20 que está en desarrollo actualmente por Genmab, un anticuerpo anti-CD20 descrito en el documento de Patente de EE.UU. n° 5.500.362, AME-133 (Applied Molecular Evolution), hA20 (Immunomedics, Inc.), HumalYM (Intracel) y PRO70769 (documento de publicación PCT n° WO 2004/056312 (PCT/US2003/040426) titulado "Immunoglobulin Variants and Uses Thereof"), trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>, Genentech) (véase, por ejemplo, el documento de patente de EE.UU. n° 5.677.171), un anticuerpo anti-Her2/neu humanizado aprobado para tratar el cáncer de mama; pertuzumab (rhuMab-2C4, Omnitarg<sup>®</sup>), que está en desarrollo por Genentech; un anticuerpo anti-Her2 descrito en el documento de Patente de EE.UU. n° 4.753.894; cetuximab (Erbix<sup>®</sup>, ImClone) (documento de Patente de EE.UU. n° 4.943.533; Publicación PCT n° WO 96/40210), un anticuerpo anti-EGFR quimérico en ensayos clínicos para una variedad de cánceres; ABX-EGF (documento de patente de EE.UU. n° 6.235.883), que está en desarrollo por Abgenix-Immunex-Amgen; HuMax-EGFr (documento de patente de EE.UU. n° de serie 10/172.317, publicada como US 2003/0091561, ahora patente de EE.UU. n° 7.247.301), que está en desarrollo por Genmab; 425, EMD55900, EMD62000 y EMD72000 (Merck KGaA) (documento de Patente de EE.UU. n° 5.558.864; Murthy et al., Arch. Biochem. Biophys., 252(2): 773-783 (1991)); ICR62 (Institute of Cancer Research) documento de publicación PCT n° WO 95/20045; 549-560 (1987); Rodeck et al., J. Cell Biochem., 35(4):315-320 (1987); Kettleborough et al., Protein Eng., 4(7): Modjtahedi et al., J. Cell Biophys., 22(1-3):129-146 (1993); Modjtahedi et al., Br. J. Cancer, 67(2):247-253 (1993); Modjtahedi et al., Br. J. Cancer, 73(2):228-235 (1996); Modjtahedi et al., Int. J. Cancer, 105(2):273-280 (2003)); TheraCIM hR3 (YM Biosciences, Canada and Centro de Immunología Molecular, Cuba (documentos de patente de EE.UU. n° 5.891.996; patente de EE.UU. n° 6.506.883; Mateo et al., Immunotechnology, 3(1): 71-81 (1997)); mAb-806 (Ludwig Institute for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering) (Jungbluth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 100(2): 639-644 (2003)); KSB-102 (KS Biomedix); MR1-1 (IVAX, National Cancer Institute) (documento de publicación PCT n° WO 01/62931); y SC100 (ScanCell) (documento de



publicación PCT n° WO 01/88138); alemtuzumab (Campath<sup>®</sup>, Millennium), un AcMo humanizado actualmente aprobado para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica de linfocitos B; muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3<sup>®</sup>), un anticuerpo anti-CD3 desarrollado por Ortho Biotech/Johnson & Johnson, ibritumomab tiuxetan (Zevalin<sup>®</sup>), un anticuerpo anti-CD20 desarrollado por IDEC/Schering AG, gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg<sup>®</sup>), un anticuerpo anti-CD33 (proteína p67) desarrollado por Celltech/Wyeth, alefacept (Amevive<sup>®</sup>), una fusión de anti-LFA-3 Fc desarrollada por Biogen), abciximab (ReoPro<sup>®</sup>), desarrollada por Centocor/Lilly, basiliximab (Simulect<sup>®</sup>), desarrollado por Novartis, palivizumab (Synagis<sup>®</sup>), desarrollado por MedImmune, infliximab (Remicade), un anticuerpo anti-TNF-alfa desarrollado por Centocor, adalimumab (Humira<sup>®</sup>), un anticuerpo anti-TNF-alfa desarrollado por Abbott Laboratories, Humicade<sup>®</sup>, un anticuerpo anti-TNF-alfa desarrollado por Celltech, golimumab (CNTO-148), un anticuerpo de TNF completamente humano desarrollado por Centocor, etanercept (Enbrel<sup>®</sup>), una fusión de receptor de p75 TNF Fc desarrollada por Immunex/Amgen, lenercept, una fusión de receptor de p55TNF Fc previamente desarrollada por Roche, ABX-CBL, un anticuerpo anti-CD147 que está desarrollado por Abgenix, ABX-IL-8, un anticuerpo anti-IL-8 que está desarrollado por Abgenix, ABX-MA1, un anticuerpo anti-MUC18 que está desarrollado por Abgenix, Pentumomab (R1549, 90Y-muHMFg1), un anti-MUC1 en desarrollo por Antisoma, Thorex (R1550), un anticuerpo anti-MUC1 que está desarrollado por Antisoma, AngioMab (AS1405), que está desarrollado por Antisoma, HUBc-1, que está desarrollado por Antisoma, Tioplatino (AS1407) que está desarrollado por Antisoma, Antegren<sup>®</sup> (natalizumab), un anticuerpo anti-alfa-4-beta-1 (VLA-4) y alfa-4-beta-7 que está desarrollado por Biogen, AcMo VLA-1, un anticuerpo anti-VLA-1 de integrina que está desarrollado por Biogen, AcMo LTBR, un anticuerpo anti-receptor beta de linfotóxina (LTBR) que está desarrollado por Biogen, CAT-152, un anticuerpo anti-TGF-β2 que está desarrollado por Cambridge Antibody Technology, ABT 874 (J695), un anticuerpo anti-IL-12 p40 que está desarrollado por Abbott Laboratories, CAT-192, un anticuerpo anti-TGFβ1 que está desarrollado por Cambridge Antibody Technology y Genzyme, CAT-213, un anticuerpo anti-Eotaxin1 que está desarrollado por Cambridge Antibody Technology, LymphoStat-B<sup>®</sup> un anticuerpo anti-Blys que está desarrollado por Cambridge Antibody Technology y Human Genome Sciences Inc., TRAIL-R1mAB, un anticuerpo anti-TRAIL-R1 que está desarrollado por Cambridge Antibody Technology y Human Genome Sciences, Inc., Avastin<sup>®</sup> bevacizumab, rhuMAB-VEGF), un anticuerpo anti-VEGF que está desarrollado por Genentech, un anticuerpo de la familia de receptores anti-HER que está desarrollado por Genentech, anticuerpo anti-factor tisular (ATF), un anticuerpo anti-factor tisular que está que está desarrollado por Genentech, Xolair<sup>®</sup> (Omalizumab), un anticuerpo anti-IgE que está desarrollado por Genentech, Raptiva<sup>®</sup> (Efalizumab), un anticuerpo anti-CD11a que está desarrollado por Genentech y Xoma, anticuerpo MLN-02 (anteriormente LDP-02), que está desarrollado por Genentech y Millennium Pharmaceuticals, HuMax CD4, un anticuerpo anti-CD4 que está desarrollado por Genmab, HuMax-IL15, un anticuerpo anti-IL15 que está desarrollado por Genmab y Amgen, HuMax-Inflam, está que está desarrollado por Genmab y Medarex, HuMax-Cancer, un anticuerpo anti-heparanasa I que está desarrollado por Genmab y Medarex y Oxford GcoSciences, HuMax-linfoma, que está desarrollado por Genmab y Amgen, HuMax-TAC, que está desarrollado por Genmab, IDEC-131 y anticuerpo anti-CD40L que está desarrollado por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-151 (Clenoliximab), un anticuerpo anti-CD4 que está desarrollado por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-114, un anticuerpo anti-CD80 que está desarrollado por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-152, un anti-CD23 que está desarrollado por IDEC Pharmaceuticals, anticuerpos anti-factor de migración de macrófagos (MIF) que están desarrollados por IDEC Pharmaceuticals, BEC2, anticuerpo anti-idiotipo que está desarrollado por ImClone, IMC-1C11, un anticuerpo anti-KDR que está desarrollado por ImClone, DC101, un anticuerpo anti-flk-1 que está desarrollado por ImClone, anticuerpos anti-VE cadherina que están desarrollados por ImClone, CEA-Cide<sup>®</sup> (labetuzumab), un anticuerpo anti-antígeno carcinoembrionario (CEA) que está desarrollado por Immunomedics, LymphoCide<sup>®</sup> (Epratuzumab), un anticuerpo anti-CD22 que está desarrollado por Immunomedics, AFP-Cide, que está desarrollado por Immunomedics, MyelomaCide, que está desarrollado por Immunomedics, LkoCide, que está desarrollado por Immunomedics, ProstaCide, que está desarrollado por Immunomedics, MDX-010, una anticuerpo anti-CTLA4 que está desarrollado por Medarex, MDX-060, un anticuerpo anti-CD30 que está desarrollado por Medarex, MDX-070 que está desarrollado por Medarex, MDX-018 que está desarrollado por Medarex, Osidem<sup>®</sup> (IDM-1) y anticuerpo anti-Her2 que está desarrollado por Medarex e Immuno-Designed Molecules, HuMax<sup>®</sup>-CD4, un anticuerpo anti-CD4 que está desarrollados por Medarex y Genmab, HuMax-IL15, un anticuerpo anti-IL15 está que está desarrollado por Medarex y Genmab, CNTO 148, un anticuerpo anti-TNFα que está desarrollado por Medarex y Centocor/Johnson & Johnson, MOR101 y MOR102, anticuerpos anti-molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) (CD54) que están desarrollados por MorphoSys, MOR201, un anticuerpo anti-receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR-3) que está desarrollado por MorphoSys, Nuvion<sup>®</sup> (visilizumab), un anticuerpo anti-CD3 que está desarrollado por Protein Design Labs, HuZAF<sup>®</sup>, un anticuerpo anti-interferón gamma desarrollado por Protein Design Labs, anti-integrina α5β1, que está desarrollado por Protein Design Labs, anti-IL-12, que está desarrollado por Protein Design Labs, ING-1, un anticuerpo anti-Ep-CAM que está desarrollado por Xoma, Xolair<sup>®</sup> (Omalizumab) un anticuerpo anti-IgE humanizado desarrollado por Genentech y Novartis y MLN01, un anticuerpo anti-integrina Beta2 que está desarrollado por Xoma. En otra realización, los agentes terapéuticos incluyen KRN330 (Kirin); anticuerpo huA33 (A33, Ludwig Institute for Cancer Research); CNTO 95 (integrinas alfa V, Centocor); MEDI-522 (integrina alfa Vβ3, Medimmune); volociximab (integrina alfa Vβ1, Biogen/PDL); AcMo humano 216 (epítipo glicosilado de linfocitos B, NCI); BiTE MT103 (bienespecifico CD19 x CD3, Medimmune); 4G7xH22 (bienespecifico linfocito B-FcγR1, Medarex/Merck KGaA); rM28 (bienespecifico CD28 x MAPG, documento de Patente Europea n° EP 1 444 268); MDX447 (EMD 82633) (bienespecifico CD64 x EGFR, Medarex); Catumaxomab (removab) (bienespecifico EpCAM x anti-CD3, Trion/Fres); Ertumaxomab (bienespecifico HER2/CD3, Fresenius Biotech); oregovomab (OvaRex) (CA-125, ViRexx); Rencarex<sup>®</sup> (WX G250) (anhidrasa carbónica IX, Willex); CNTO 888 (CCL2, Centocor); TRC105 (CD105 (endoglina), Tracn); BMS-663513 (agonista de

CD137, Bristol Myers Squibb); MDX-1342 (CD19, Medarex); Sipilizumab (MEDI-507) (CD2, Medimmune); Ofatumumab (HuMax-CD20) (CD20, Genmab); Rituximab (Rituxan) (CD20, Genentech); veltuzumab (hA20) (CD20, Immunomedics); Epratuzumab (CD22, Amgen); lumiliximab (IDEC 152) (CD23, Biogen); muromonab-CD3 (CD3, Ortho); HuM291 (receptor de CD3 fc, PDL Biopharma); HeFi-1, CD30, NCI); MDX-060 (CD30, Medarex); MDX-1401 (CD30, Medarex); SGN-30 (CD30, Seattle Genentics); SGN-33 (Lintuzumab) (CD33, Seattle Genentics); Zanolimumab (HuMax-CD4) (CD4, Genmab); HCD122 (CD40, Novartis); SGN-40 (CD40, Seattle Genentics); Campath1h (Alemtuzumab) (CD52, Genzyme); MDX-1411 (CD70, Medarex); hLL1 (EPB-1) (CD74.38, Immunomedics); Galiximab (IDEC-144) (CD80, Biogen); MT293 (TRC093/D93) (colágeno escindido, Tracon); HuLuc63 (CS1, PDL Pharma); ipilimumab (MDX-010) (CTLA4, Bristol Myers Squibb); Tremelimumab (Ticilimumab, CP-675,2) (CTLA4, Pfizer); HGS-ETR1 (Mapatumumab) (agonista de DR4 TRAIL-R1, Human Genome Science/Glaxo Smith Kline); AMG-655 (DR5, Amgen); Apomab (DR5, Genentech); CS-1008 (DR5, Daiichi Sankyo); HGS-ETR2 (lexatumumab) (agonista de DR5 TRAIL-R2, HGS); Cetuximab (Erbix) (EGFR, ImClone); IMC-11F8, (EGFR, ImClone); Nimotuzumab (EGFR, YM Bio); Panitumumab (Vectabix) (EGFR, Amgen); Zalutumumab (HuMaxEGFr) (EGFR, Genmab); CDX-110 (EGFRvIII, AVANT Immunotherapeutics); adegatumumab (MT201) (EpCAM, Merck); edrecolomab (Panorex, 17-1A) (EpCAM, Glaxo/Centocor); MORAb-003 (receptor de folato A, Morphotech); KW-2871 (gangliósido GD3, Kyowa); MORAb-009 (GP-9, Morphotech); CDX-1307 (MDX-1307) (hCGb, Celldex); Trastuzumab (Herceptina) (HER2, Celldex); Pertuzumab (rhuMab 2C4) (HER2 (DI), Genentech); apolizumab (cadena beta de HLA-DR, PDL Pharma); AMG-479 (IGF-1R, Amgen); anti-IGF-1R R1507 (IGF1-R, Roche); CP 751871 (IGF1-R, Pfizer); IMC-A12 (IGF1-R, ImClone); BII022 (IGF-1R, Biogen); Mik-beta-1 (IL-2RB (CD122), Hoffman LaRoche); CNTO 328 (IL6, Centocor); Anti-KIR (1-7F9) (receptor similar a Ig de células asesinas (KIR, Novo); Hu3S193 (Lewis (y), Wyeth, Ludwig Institute for Cancer Research); hCBE-11 (LTβR, Biogen); HuHMFG1 (MUC1, Antisoma/NCI); RAV12 (epitopo de carbohidrato ligado a N, Raven); CAL (proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTH-rP), Universidad de California); CT-011 (PD1, CureTech); MDX-1106 (ono-4538) (PD1, Medarex/Ono); AcMo CT-011 (PD1, Curetech); IMC-3G3 (PDGFRa, ImClone); bavituximab (fosfatidilserina, Peregrine); huJ591 (PSMA, Fundación de Investigación de Cornell); muJ591 (PSMA, Fundación de Investigación de Cornell); GC1008 (inhibidor de TGFb (pan) (IgG4), Genzyme); Infliximab (Remicade) (TNFa, Centocor); A27.15 (receptor de transferrina, Salk Institute, INSERM, documento de Publicación PCT nº WO 2005/111082); E2.3 (receptor de transferrina, Salk Institute); Bevacizumab (Avastina) (VEGF, Genentech); HuMV833 (VEGF, Tsukuba Research Lab, documento de publicación PCT nº WO 2000/034337, Universidad de Texas); IMC-18F1 (VEGFR1, ImClone); IMC-1121 (VEGFR2, ImClone).

### C. Construcción de proteínas de unión DVD-Ig®

Se diseña una proteína de unión multivalente multiespecífica de dominio variable doble de inmunoglobulina (DVD-Ig®) de tal manera que dos dominios variables diferentes de la cadena ligera (VL) procedentes de dos anticuerpos monoclonales parentales diferentes están ligados en tándem directamente o mediante un enlazador corto mediante técnicas de ADN recombinante, seguidos por el dominio constante de la cadena ligera. Del mismo modo, la cadena pesada comprende dos dominios variables diferentes de la cadena pesada (VH) ligados en tándem, seguidos por el dominio constante CH1 y la región Fc.

Los dominios variables se pueden obtener utilizando técnicas de ADN recombinante a partir de un anticuerpo parental generado por uno cualquiera de los métodos descritos en este documento. En una realización, el dominio variable es un dominio variable de la cadena pesada o ligera murina. En otra realización, el dominio variable es un dominio variable de la cadena pesada o ligera injertado con CDR o humanizado. En una realización, el dominio variable es un dominio variable de la cadena pesada o ligera humana.

En una realización, el primer y el segundo dominio variable están unidos directamente entre sí utilizando técnicas de ADN recombinante. En otra realización, los dominios variables están unidos a través de una secuencia enlazadora. En una realización, dos dominios variables están unidos. Tres o más dominios variables también pueden estar unidos directamente o por medio de una secuencia enlazadora. Los dominios variables pueden unirse al mismo antígeno o se pueden unir a diferentes antígenos. Las moléculas DVD-Ig de la invención pueden incluir un dominio variable de inmunoglobulina y un dominio variable de no inmunoglobulina, tal como un dominio de unión a ligando de un receptor, un dominio activo de una enzima. Las moléculas DVD-Ig también pueden comprender dos o más dominios no Ig.

La secuencia enlazadora puede ser un solo aminoácido o un polipéptido enlazador que comprende dos o más residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. En una realización, una secuencia enlazadora se selecciona entre el grupo que consiste en GGGGSG (SEQ ID NO:26), GSGG (SEQ ID NO:27), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:28), GSGGGGGSG (SEQ ID NO:223), GSGGGGGSGS (SEQ ID NO:29), GSGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:30), GGGGSGGGGGSGGGG (SEQ ID NO:31), GGGGSGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:32), ASTKGP (SEQ ID NO:33), ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:34), TVAAP (SEQ ID NO:35), RTVAAP (SEQ ID NO:224), TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO:36), RTVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO:225), AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO:37), AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO:38), AKTTPKLGG (SEQ ID NO:39), SAKTTPKLGG (SEQ ID NO:40), SAKTTP (SEQ ID NO:41), RADAAP (SEQ ID NO:42), RADAAPTVS (SEQ ID NO:43), RADAAAAGGPGS (SEQ ID NO:44), RADAAAAGGGGSGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:45), SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO:46), ADAAP (SEQ ID NO:47), ADAAPTVSIFPP (SEQ ID NO:48), QPKAAP (SEQ ID NO:49), QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO:50), AKTTPP (SEQ ID NO:51), AKTTPPSVTLPLAP (SEQ ID NO:52), AKTTAP (SEQ ID NO:53), AKTTAPSVYPLAP (SEQ

ID NO:54), GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO:55), GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO:56) y GHEAAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO:57). La elección de las secuencias enlazadoras se basa en un análisis de la estructura cristalina de varias moléculas Fab. Existe un enlace flexible natural entre el dominio variable y el dominio constante CH1/CL en el Fab o la estructura molecular del anticuerpo. Este enlace natural comprende aproximadamente 10-12 residuos de aminoácidos, aportados por 4-6 residuos desde el extremo C-terminal del dominio V y 4-6 residuos del extremo N-terminal del dominio CL/CH1. Las DVD-Igs descritas en este documento se pueden generar utilizando 5-6 residuos de aminoácidos N-terminales, o 11-12 residuos de aminoácidos, de CL o CH1 como enlazador en la cadena ligera y la cadena pesada de DVD-Ig, respectivamente. Los residuos N-terminales de los dominios CL o CH1, en particular los primeros 5-6 residuos de aminoácidos, adoptan una conformación de bucle sin estructuras secundarias fuertes y por lo tanto pueden actuar como enlazadores flexibles entre los dos dominios variables. Los residuos N-terminales de los dominios CL o CH1 son una extensión natural de los dominios variables, ya que forman parte de las secuencias de Ig y por lo tanto minimizan en gran medida cualquier inmunogenicidad que surja potencialmente de los enlazadores y las uniones.

Otras secuencias enlazadoras pueden incluir cualquier secuencia de cualquier longitud del dominio CL/CH1, pero no todos los residuos del dominio CL/CH1; por ejemplo los primeros 5-12 residuos de aminoácidos de los dominios CL/CH1; los enlazadores de la cadena ligera pueden proceder de C $\kappa$  o C $\lambda$ ; y los enlazadores de la cadena pesada se pueden obtener a partir de CH1 de cualquier isotipo, incluyendo C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 3, C $\gamma$ 4, C $\alpha$ 1, C $\alpha$ 2, C $\delta$ , C $\epsilon$  y C $\mu$ . Las secuencias enlazadoras también se pueden obtener a partir de otras proteínas tales como proteínas similares a Ig (por ejemplo, TCR, FcR, KIR); secuencias basadas en G/S; secuencias obtenidas a partir de la región bisagra; y otras secuencias naturales de otras proteínas.

En una realización, un dominio constante está ligado a los dos dominios variables unidos, utilizando técnicas de ADN recombinante. En una realización, una secuencia que comprende los dominios variables de la cadena pesada unidos en tándem, está ligada a un dominio constante de la cadena pesada y una secuencia que comprende los dominios variables de la cadena ligera unidos en tándem, está ligada a un dominio constante de la cadena ligera. En una realización, los dominios constantes son un dominio constante de la cadena pesada humana y un dominio constante de la cadena ligera humana, respectivamente. En una realización, la cadena pesada de DVD está unida además a una región Fc. La región Fc puede ser una región Fc de secuencia natural o una región Fc variante. En otra realización, la región Fc es una región Fc humana. En otra realización, la región Fc incluye la región Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE o IgD.

En una realización más preferida, dos polipéptidos DVD de cadena pesada y dos polipéptidos DVD de cadena ligera se combinan para formar una molécula DVD-Ig. Una descripción detallada de moléculas DVD-Ig específicas, capaces de unirse a antígenos diana específicos, tales como IL-1 $\beta$  y los métodos para prepararlas, se proporcionan en la sección de Ejemplos a continuación.

#### D. Producción de proteínas de unión DVD-Ig

Las proteínas de unión DVD-Ig de la presente invención se pueden producir por cualquiera entre una serie de métodos conocidos en la técnica incluyendo, por ejemplo, la expresión desde células hospedadoras, en donde el o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesadas de DVD-Ig y las cadenas ligeras de DVD-Ig se transfectan en una célula hospedadora mediante técnicas convencionales. Las diversas formas del término "transfección" se entiende que incluyen una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procarionta o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es posible expresar las proteínas DVD-Ig de la invención tanto en células hospedadoras procariontas como eucariotas, las proteínas DVD-Ig se expresan en células eucariotas, por ejemplo, células hospedadoras de mamífero, porque tales células eucariotas (y, en particular, células de mamífero) tienen más probabilidad que las células procariontas de ensamblarse y secretar una proteína DVD-Ig plegada correctamente e inmunológicamente activa.

Ejemplos de células hospedadoras de mamífero para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención, incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216-4220 (1980), usadas con un marcador seleccionable con DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman y Sharp, J. Mol Biol., 159: 601-621 (1982)), células de mieloma NS0, células COS y células SP2 y PER.C6. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican proteínas DVD-Ig se introducen en células hospedadoras de mamífero, las proteínas DVD-Ig se producen cultivando las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión de las proteínas DVD-Ig en las células hospedadoras o la secreción de las proteínas DVD-Ig en el medio de cultivo en el que se cultivan las células hospedadoras. Las proteínas DVD-Ig pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos convencionales de purificación de proteínas.

En un sistema a modo de ejemplo para la expresión recombinante de las proteínas DVD-Ig de la invención, un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada de DVD-Ig como la cadena ligera de DVD-Ig, se introduce en células CHO dhfr- mediante transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de las cadenas pesadas y ligeras de DVD-Ig están ligados cada uno funcionalmente con elementos reguladores de potenciador CMV/promotor AdMLP para impulsar altos niveles de

transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también es portador de un gen DHFR, que permite la selección de las células CHO que han sido transfectadas con el vector usando selección/amplificación con metotrexato. Las células hospedadoras transformantes seleccionadas se cultivan para permitir una expresión de las cadenas pesadas y ligeras de DVD-Ig y se recupera una de proteína DVD-Ig intacta desde el medio de cultivo. Se emplean técnicas de biología molecular convencionales para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospedadoras, seleccionar los transformantes, cultivar las células hospedadoras y recuperar la proteína DVD-Ig desde el medio de cultivo. Técnicas de biología molecular convencionales se utilizan para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospedadoras, seleccionar los transformantes, cultivar las células hospedadoras y recuperar la proteína DVD-Ig del medio de cultivo. Todavía adicionalmente, la invención proporciona un método de síntesis de una proteína DVD-Ig de la invención cultivando una célula hospedadora de la invención en un medio de cultivo adecuado hasta que una proteína DVD-Ig de la invención se sintetiza. El método puede comprender además aislar la proteína DVD-Ig desde el medio de cultivo.

Una característica importante de DVD-Ig es que se puede producir y purificar de un modo similar a un anticuerpo convencional. La producción de DVD-Ig da lugar a un producto principal homogéneo, individual con actividad específica doble deseada, sin ninguna modificación de la secuencia de la región constante o modificaciones químicas de ningún tipo. Otros métodos descritos anteriormente para generar proteínas de unión "bienespecíficas", "multiespecíficas" y "multiespecíficas multivalentes" de longitud completa no conducen a un único producto principal, pero en su lugar conducen a la producción intracelular o secretada de una mezcla de proteínas de unión ensambladas inactivas, monoespecíficas, multiespecíficas, multivalentes, de longitud completa y proteínas de unión de longitud completa multivalentes con una combinación de diferentes sitios de unión. A modo de ejemplo, basado en el diseño descrito por Miller y Presta (documento de Publicación PCT n° WO 2001/077342), hay 16 posibles combinaciones de cadenas pesadas y ligeras. En consecuencia, solamente el 6,25% de la proteína es probable que esté en la forma activa deseada y no como un producto principal aislado o un producto primario aislado, en comparación con las otras 15 posibles combinaciones. La separación de las formas deseadas, totalmente activas de la proteína a partir de las formas inactivas y parcialmente activas de la proteína utilizando técnicas de cromatografía convencionales, que se utilizan normalmente en la preparación a gran escala, aún no se ha demostrado.

Sorprendentemente, el diseño de las "proteínas de unión multivalentes de doble especificidad de longitud completa" de la presente invención conduce a una cadena ligera del dominio variable doble y a una cadena pesada del dominio variable doble que se ensamblan principalmente en las "proteínas de unión multivalentes de doble especificidad de longitud completa" deseadas.

Al menos el 50%, al menos el 75% y al menos el 90% de las moléculas DVD-Ig ensambladas y expresadas son la proteína tetravalente de doble especificidad deseada. Este aspecto de la invención mejora particularmente la utilidad comercial de la invención. Por lo tanto, la presente invención incluye un método para expresar una cadena ligera del dominio variable doble y una cadena pesada del dominio variable doble en una sola célula, lo que conduce a un solo producto primario de una "proteína de unión tetravalente de doble especificidad de longitud completa".

La presente invención proporciona métodos para expresar una cadena ligera de dominio variable doble y una cadena pesada de dominio variable doble en una sola célula, lo que conduce a un "producto primario" de una "proteína de unión tetravalente de doble especificidad de longitud completa", en donde el "producto primario" es más que el 50% de toda la proteína ensamblada, que comprende una cadena ligera de dominio variable doble y una cadena pesada de dominio variable doble.

La presente invención proporciona métodos para expresar una cadena ligera de dominio variable doble y una cadena pesada de dominio variable doble en una sola célula, lo que conduce a un único "producto primario" de una "proteína de unión tetravalente de doble especificidad de longitud completa", en donde el "producto primario" es más que el 75% de toda la proteínas ensamblada, que comprende una cadena ligera del dominio variable doble y una cadena pesada de dominio variable doble.

La presente invención proporciona métodos para expresar una cadena ligera de dominio variable doble y una cadena pesada de dominio variable doble en una sola célula, lo que conduce a un único "producto primario" de una "proteína de unión tetravalente de doble especificidad de longitud completa", en donde el "producto primario" es más que el 90% de toda la proteína ensamblada, que comprende una cadena ligera de dominio variable doble y una cadena pesada de dominio variable doble.

## 6. Producción de proteínas que se unen a IL-1 $\beta$ y líneas celulares productoras de proteínas de unión

Preferiblemente, las proteínas que se unen a IL-1 $\beta$ , incluyendo anticuerpos anti-IL-1 $\beta$ , de la presente invención presentan una alta capacidad para reducir o neutralizar la actividad de IL-1 $\beta$ , por ejemplo, tal como se evalúa mediante uno cualquiera de varios ensayos *in vitro* y *en vivo* conocidos en la técnica. Preferiblemente, las proteínas de la presente invención que se unen a IL-1 $\beta$ , también presentan una alta capacidad para reducir o neutralizar la actividad de IL-1 $\beta$ .

En realizaciones preferidas, una proteína de unión, o una porción de la misma que se une a antígeno, se une a IL-1 $\beta$  humana, en donde la proteína de unión, o una porción de la misma que se une a antígeno, se disocia de la IL-1 $\beta$

humana con una constante de tasa  $k_{off}$  de aproximadamente  $0,1 \text{ s}^{-1}$  o menos, según se determina por resonancia de plasmón superficial, o inhibe la actividad de IL-1 $\beta$  humana con una  $CI_{50}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-6} \text{ M}$  o menos. Alternativamente, la proteína de unión, o una porción de la misma que se une a antígeno, se puede disociar de IL-1 $\beta$  humana con una constante de tasa  $k_{off}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  o menos, según se determina por resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad de IL-1 $\beta$  humana con una  $CI_{50}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-7} \text{ M}$  o menos. Alternativamente, la proteína de unión, o una porción de la misma que se une a antígeno, se puede disociar de IL-1 $\beta$  humana con una constante de tasa  $k_{off}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  o menos, según se determina por resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir IL-1 $\beta$  humana con una  $CI_{50}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-8} \text{ M}$  o menos. Alternativamente, la proteína de unión, o una porción de la misma que se une a antígeno, se puede disociar de IL-1 $\beta$  humana con una constante de tasa  $k_{off}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  o menos, según se determina por resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad de IL-1 $\beta$  humana con una  $CI_{50}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-9} \text{ M}$  o menos. Alternativamente, la proteína de unión, o una porción de la misma que se une a antígeno, se puede disociar de IL-1 $\beta$  humana con una constante de tasa  $k_{off}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  o menos, según se determina por resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad de IL-1 $\beta$  humana con una  $CI_{50}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-10} \text{ M}$  o menos. Alternativamente, la proteína de unión, o una porción de la misma que se une a antígeno, se puede disociar de IL-1 $\beta$  humana con una constante de tasa  $k_{off}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  o menos, según se determina por resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad de IL-1 $\beta$  humana con una  $CI_{50}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-11} \text{ M}$  o menos.

En ciertas realizaciones, la proteína de unión comprende una región constante de la cadena pesada, tal como una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. Preferiblemente, la región constante de la cadena pesada es una región constante de la cadena pesada de IgG1 o una región constante de la cadena pesada de IgG4. Además, el anticuerpo puede comprender una región constante de la cadena ligera, o bien una región constante de la cadena ligera kappa o una región constante de la cadena ligera lambda. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena ligera kappa. Alternativamente, la porción de anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab o un fragmento Fv de cadena sencilla.

Los reemplazamientos de residuos de aminoácidos en la porción Fc para alterar la función efectora de anticuerpos son conocidos en la técnica (Winter et al., documentos de Patente de EE.UU. n° 5.648.260 y 5.624.821). La porción Fc de un anticuerpo es mediadora en varias funciones efectoras importantes, por ejemplo, inducción de citocinas, ADCC, fagocitosis, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y semivida/tasa de aclaramiento del anticuerpo y de complejos antígeno-anticuerpo. En algunos casos, estas funciones efectoras son deseables para un anticuerpo terapéutico, pero en otros casos podrían ser innecesarias o incluso perjudiciales, dependiendo de las dianas terapéuticas. Ciertos isotipos de IgG humana, particularmente IgG1 e IgG3, median en ADCC y CDC mediante la unión a Fc $\gamma$ Rs y C1q del complemento, respectivamente. Los receptores de Fc neonatal (FcRn) son los componentes decisivos que determinan la semivida circulante de los anticuerpos. En todavía otra realización, al menos un residuo de aminoácido se sustituye en la región constante del anticuerpo, por ejemplo, la región Fc del anticuerpo, de manera que se alteran las funciones efectoras del anticuerpo.

Una realización proporciona una proteína de unión marcada en donde un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención se derivatiza o se une a otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido o proteína). Por ejemplo, una proteína de unión marcada de la invención se puede obtener mediante el enlace funcional de un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) con una o varias entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico y/o una proteína o un péptido que puede mediar en la asociación del anticuerpo o una porción de anticuerpo con otra molécula (tal como una región del núcleo de estreptavidina o un marcador de polihistidina).

Los agentes detectables útiles con los que se puede derivatizar una proteína de unión, tal como un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención, incluyen compuestos fluorescentes. Agentes detectables ejemplares fluorescentes incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalensulfonilo, ficoeritrina y similares. Un anticuerpo también se puede derivatizar con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa y similares. Cuando un anticuerpo se derivatiza con una enzima detectable, se detecta añadiendo reactivos adicionales que la enzima utiliza para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando el agente detectable peroxidasa de rábano picante está presente, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable. Un anticuerpo también se puede derivatizar con biotina y detectarse a través de una medición indirecta de la unión de avidina o estreptavidina.

Otra realización de la invención proporciona una proteína de unión cristalizada. Preferiblemente, la invención se refiere a cristales de anticuerpos anti-IL-1 $\beta$  completos y a fragmentos de los mismos como se describe en esta memoria, y a formulaciones y composiciones que comprenden tales cristales. En una realización, la proteína de unión cristalizada tiene una mayor semivida *in vivo* que el homólogo soluble de la proteína de unión. En otra realización, la proteína de unión conserva la actividad biológica después de la cristalización.

Una proteína de unión cristalizada de la invención se puede producir según métodos conocidos en la técnica y como se describe en el documento de publicación PCT n° WO 02/072636.

Otra realización de la invención proporciona una proteína de unión glicosilada en donde el anticuerpo o una porción del mismo que se une a antígeno comprende uno o varios residuos de carbohidrato. La producción de proteína naciente *in vivo* puede someterse a un procesamiento adicional, conocido como modificación postraduccional. En particular, se pueden añadir enzimáticamente residuos de azúcar (glicosilo), un proceso conocido como glicosilación.

5 Las proteínas resultantes que son portadoras de cadenas laterales de oligosacáridos unidos covalentemente, se conocen como proteínas o glicoproteínas glicosiladas.

Los anticuerpos de origen natural son glicoproteínas con uno o varios residuos de carbohidrato en el dominio Fc, así como el dominio variable. Los residuos de carbohidrato en el dominio Fc tienen un efecto importante sobre la función efectora del dominio Fc, con un efecto mínimo sobre la unión al antígeno o la semivida del anticuerpo (Jefferis, R., *Biotechnol. Prog.*, 21: 11-16 (2005)). En contraste, la glicosilación del dominio variable puede tener un efecto sobre la actividad de unión a antígeno del anticuerpo. La glicosilación en el dominio variable puede tener un efecto negativo sobre la afinidad de la unión del anticuerpo, probablemente debido al impedimento estérico (Co et al., *Mol. Immunol.*, 30: 1361- 1367 (1993)), o producir una mayor afinidad hacia el antígeno (Wallick et al., *J. Exp. Med.*, 168: 1099-1109 (1988); Wright et al., *EMBO J.*, 10: 2717-2723 (1991)).

15 Un aspecto de la presente invención se dirige a la generación de mutantes del sitio de glicosilación, en donde se ha mutado el sitio de glicosilación ligado a O o a N de la proteína de unión. Un experto en la técnica puede generar tales mutantes usando tecnologías convencionales bien conocidas. Mutantes del sitio de glicosilación que conservan la actividad biológica pero que han aumentado o disminuido la actividad de unión, son otro objeto de la presente invención.

20 En todavía otra realización, se modifica la glicosilación del anticuerpo o de una porción que se une a antígeno de la invención. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo no glicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo hacia el antígeno. Tales modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr, por ejemplo, mediante una alteración de uno o varios de los sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden realizar una o varias sustituciones de aminoácidos que dan lugar a la eliminación de uno o varios sitios de glicosilación de la región variable, para eliminar de ese modo una glicosilación en ese sitio. Tal aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo hacia el antígeno. Un enfoque de este tipo se describe con más detalle en el documento de publicación PCT nº WO 2003/016466 y las patentes de EE.UU. nº 5.714.350 y 6.350.861.

Adicional o alternativamente, una proteína de unión modificada de la invención se puede preparar de modo que tenga un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos fucosilo (véase, Kanda et al., *J. Biotechnol.*, 130(3): 300-310 (2007)) o un anticuerpo que tiene incrementadas las estructuras bisectrices de GlcNAc. Tales patrones de glicosilación alterados han demostrado aumentar la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr, por ejemplo, mediante la expresión del anticuerpo en una célula hospedadora con una maquinaria de glicosilación alterada. Las células con una maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y se pueden utilizar como células hospedadoras en las que se expresan anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con la glicosilación alterada. Véase, por ejemplo Shields et al., *J. Biol. Chem.*, 277: 26733-26740 (2002); Umana et al., "Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity", *Nat. Biotechnol.*, 17: 176-180 (1999), así como los documentos de Publicación europea nº EP 1 176 195; Publicación PCT nº WO 03/035835 y WO 99/54342.

La glicosilación de proteínas depende de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, así como de la célula hospedadora en la que se expresa la proteína. Diferentes organismos pueden producir diferentes enzimas de glicosilación (por ejemplo, glicosiltransferasas y glicosidasas) y tienen diferentes sustratos (azúcares de nucleótidos) disponibles. Debido a tales factores, el patrón de glicosilación de proteínas y la composición de los residuos de glicosilo, pueden diferir dependiendo del sistema hospedador en el que se expresa la proteína particular. Residuos de glicosilo útiles en la invención pueden incluir, pero no están limitados a, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico. Preferiblemente, la proteína de unión glicosilada comprende residuos de glicosilo, de tal manera que el patrón de glicosilación es humano.

Es conocido por los expertos en la técnica que una glicosilación diferente de las proteínas puede dar como resultado diferentes características proteicas. Por ejemplo, la eficacia de una proteína terapéutica producida en un microorganismo hospedador, tal como levadura y glicosilada utilizando la ruta endógena de la levadura, se puede reducir en comparación con la de la misma proteína expresada en una célula de mamífero, tal como una línea celular CHO. Tales glicoproteínas también pueden ser inmunógenas en los seres humanos y muestran una reducción de la semivida *in vivo* después de la administración. Los receptores específicos en los seres humanos y otros animales pueden reconocer residuos de glicosilo específicos y favorecer el aclaramiento rápido de la proteína desde la sangre. Otros efectos adversos pueden incluir cambios en el plegamiento de la proteína, solubilidad, susceptibilidad a proteasas, tráfico, transporte, compartimentalización, secreción, reconocimiento por otras proteínas o factores, antigenicidad o alergenicidad. Por consiguiente, un profesional en la técnica puede preferir una proteína terapéutica con una composición y un patrón de glicosilación específicos, por ejemplo, una composición y un patrón de glicosilación idénticos, o al menos similares, al producido en las células humanas o en las células específicas de especie, del animal objeto deseado.

El que las proteínas glicosiladas se expresen de forma diferente a la de una célula hospedadora, se puede conseguir modificando genéticamente la célula hospedadora para expresar enzimas de glicosilación heterólogas. Utilizando métodos conocidos en la técnica, un profesional puede generar anticuerpos o porciones de los mismos que se unen a antígeno que muestran una glicosilación de las proteínas humana. Por ejemplo, se han modificado genéticamente cepas de levadura para expresar enzimas de glicosilación de origen no natural, de modo que las proteínas glicosiladas (glicoproteínas) producidas en estas cepas de levadura muestran una glicosilación de las proteínas idéntica a la de las células animales, especialmente células humanas (documentos de Publicación de EE.UU. nº 2004/0018590 y 2002/0137134).

Además de las proteínas de unión, la presente descripción está también dirigida a anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) específicos de tales proteínas de unión de la invención. Un anticuerpo anti-Id es un anticuerpo, que reconoce determinantes únicos, generalmente asociados con la región de unión al antígeno de otro anticuerpo. El anti-Id se puede preparar mediante la inmunización de un animal con la proteína de unión o una región que contiene CDRs de la misma. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante y producirá un anticuerpo anti-Id. Es claramente evidente que puede ser más fácil generar anticuerpos anti-idiotípicos para los dos o más anticuerpos parentales incorporados en una molécula DVD-Ig; y confirmar los estudios de la unión por métodos bien reconocidos en la técnica (por ejemplo, BIAcore, ELISA) para verificar que los anticuerpos anti-idiotípicos específicos para el idiotipo de cada anticuerpo parental también reconocen el idiotipo (por ejemplo, el sitio de unión a antígeno) en el contexto de la DVD-Ig. Los anticuerpos anti-idiotípicos específicos para cada uno de los dos o más sitios de unión a antígeno de una DVD-Ig proporcionan reactivos ideales para medir las concentraciones de DVD-Ig de una DVD-Ig humana en el suero del paciente. Por ejemplo, ensayos de la concentración de DVD-Ig se pueden establecer usando un "formato de ensayo ELISA de tipo sándwich" con un anticuerpo para una primera región de unión al antígeno recubierta sobre la fase sólida (por ejemplo, chip de BIAcore, placa de ELISA, etc.), aclarando con tampón de aclarado, incubando con una muestra de suero, otra etapa de aclarado y en última instancia una incubación con otro anticuerpo anti-idiotípico para el otro sitio de unión al antígeno, marcado este último con una enzima para la cuantificación de la reacción de unión. En una realización, para una DVD-Ig con más de dos sitios de unión diferentes, anticuerpos anti-idiotípicos para los dos sitios de unión más exteriores (más distales y proximales de la región constante) no solo ayudan en la determinación de la concentración de la DVD-Ig en suero humano, sino que también documentan la integridad de la molécula *in vivo*. Cada anticuerpo anti-Id también se puede usar como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmune en aún otro animal, produciendo un anticuerpo denominado anti-anti-Id.

Además, un experto en la técnica apreciará que una proteína de interés se puede expresar utilizando un banco de células hospedadoras manipuladas genéticamente para expresar diversas enzimas de glicosilación, de tal manera que las células hospedadoras miembros del banco producen la proteína de interés con patrones de glicosilación variantes. Un profesional en la técnica puede entonces seleccionar y aislar la proteína de interés con determinados patrones de glicosilación novedosos. Preferiblemente, la proteína que tiene un patrón de glicosilación novedoso seleccionado particularmente muestra propiedades biológicas mejoradas o alteradas.

## 7. Usos de proteínas de unión a IL-1 $\beta$

Teniendo en cuenta su capacidad para unirse a IL-1 $\beta$  humana, las proteínas de unión a IL-1 $\beta$  o porciones de las mismas que se unen a antígeno, de la invención se pueden usar para detectar IL-1 $\beta$  (por ejemplo, en una muestra biológica, tal como suero o plasma), usando un inmunoensayo convencional, tal como ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica de tejidos. La descripción proporciona un método para detectar IL-1 $\beta$  en una muestra biológica que comprende poner en contacto una muestra biológica con una proteína de unión, o una porción que se une a antígeno, de la invención y detectar ya sea la proteína de unión (o una porción que se une a antígeno) unida a IL-1 $\beta$  o la proteína de unión no unida (o una porción de unión), para detectar de ese modo IL-1 $\beta$  en la muestra biológica. La proteína de unión se marca directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Las sustancias detectables adecuadas incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y ejemplos de material radiactivo adecuado incluye  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{166}\text{Ho}$  o  $^{153}\text{Sm}$ .

De forma alternativa al marcado de la proteína de unión, la IL-1 $\beta$  humana se puede someter a ensayo en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo de competencia utilizando patrones de rh IL-1 $\beta$  marcados con una sustancia detectable y una proteína de unión a IL-1 $\beta$  humana sin marcar. En este ensayo, la muestra biológica, los patrones de rh IL-1 $\beta$  marcados y la proteína de unión a IL-1 $\beta$  humana se combinan y se determina la cantidad de patrón de rh IL-1 $\beta$  marcado unido al anticuerpo sin marcar. La cantidad de IL-1 $\beta$  humana en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón de rh IL-1 $\beta$  marcado unido a la proteína de unión a IL-1 $\beta$ . Del mismo modo, la IL-1 $\beta$  humana también se puede someter a ensayo en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo de competencia, utilizando patrones de rh IL-1 $\beta$  marcados con una sustancia detectable y una proteína de unión a IL-1 $\beta$  humana sin marcar.

Las proteínas de unión y las porciones que se unen a IL-1 de la invención son capaces preferiblemente de neutralizar la actividad de IL-1 $\beta$  humana, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por consiguiente, tales proteínas de unión y porciones de las mismas que se unen a IL-1 $\beta$  de la invención, pueden usarse para inhibir la actividad de IL-1 $\beta$  humana, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene IL-1 $\beta$  humana, en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que tienen IL-1 $\beta$  con la que un anticuerpo de la invención reacciona de forma cruzada. En una realización, la invención proporciona un método para inhibir la actividad de IL-1 $\beta$  humana, que comprende poner en contacto IL-1 $\beta$  humana con una proteína de unión a IL-1 $\beta$  o una porción que se une de la misma de la invención, de modo que se inhibe la actividad de IL-1 $\beta$  humana. Por ejemplo, en un cultivo celular que contiene, o se sospecha que contiene, IL-1 $\beta$  humana, una proteína de unión a IL-1 $\beta$  o una porción que se une de la misma, de la invención se puede añadir al medio de cultivo para inhibir la actividad de IL-1 $\beta$  humana en el cultivo.

En otra realización, la invención permite un método para reducir la actividad de IL-1 $\beta$  humana en un sujeto, ventajosamente de un sujeto que padece una enfermedad o un trastorno en el que la actividad de IL-1 $\beta$  es perjudicial. La invención permite métodos para reducir la actividad de IL-1 $\beta$  en un sujeto que padece una enfermedad o un trastorno, cuyo método comprende administrar al sujeto un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención, de modo que la actividad de IL-1 $\beta$  en el sujeto se reduce. Preferiblemente, la IL-1 $\beta$  es IL-1 $\beta$  humana y el sujeto es un sujeto humano. Alternativamente, el sujeto puede ser un mamífero que expresa una IL-1 $\beta$  a la que es capaz de unirse un anticuerpo de la invención. Aún más, el sujeto puede ser un mamífero en el que se ha introducido IL-1 $\beta$  (por ejemplo, mediante la administración de IL-1 $\beta$  o mediante la expresión de un transgén de IL-1 $\beta$ ). Una proteína de unión a IL-1 $\beta$  de la invención se puede administrar a un sujeto humano para fines terapéuticos. Por otra parte, una proteína de unión de la invención se puede administrar a un mamífero no humano que expresa IL-1 $\beta$  con la que el anticuerpo es capaz de unirse con fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Sobre esto último, tales modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, ensayos de dosificaciones y evolución temporal de una administración).

Tal como se utiliza en este documento, la expresión "un trastorno en el que la actividad de IL-1 $\beta$  es perjudicial" se entiende que incluye enfermedades y otros trastornos en los que la presencia de IL-1 $\beta$  en un sujeto que padece el trastorno se ha mostrado que es, o es sospechosa de ser, responsable de la fisiopatología del trastorno o es un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno. Por consiguiente, un trastorno en el que la actividad de IL-1 $\beta$  es perjudicial, es un trastorno en el que se espera que una reducción de la actividad de IL-1 $\beta$  alivie los síntomas y/o la progresión del trastorno. Tales trastornos pueden ser evidenciados, por ejemplo, por un aumento en la concentración de IL-1 $\beta$  en un fluido biológico de un sujeto que padece el trastorno (por ejemplo, un aumento en la concentración de IL-1 $\beta$  en suero, plasma, líquido sinovial, etc. del sujeto), lo que se puede detectar, por ejemplo, utilizando un anticuerpo anti-IL-1 $\beta$  como se ha descrito anteriormente. Ejemplos no limitantes de trastornos que se pueden tratar con los anticuerpos de la invención incluyen aquellos trastornos descritos en la sección de abajo que se refiere a composiciones farmacéuticas de los anticuerpos de la invención.

Las DVD-Igs de la descripción se pueden unir a IL-1 $\beta$  sola o a múltiples antígenos (por ejemplo, IL-1 $\beta$  humana y otro antígeno que no es IL-1 $\beta$ ). Por lo tanto, una DVD-Ig puede bloquear o reducir la actividad de hu IL-1 $\beta$  y la actividad de otro antígeno diana. Tales otros antígenos diana pueden incluir dianas solubles (por ejemplo, It-1 $\alpha$ ) y dianas de receptores de la superficie celular (por ejemplo, VEGFR, EGFR).

Tales otros antígenos incluyen, pero no se limitan a, las dianas enumeradas en bases de datos disponibles públicamente, en donde las bases de datos incluyen aquellos que están disponibles en la red mundial y se incorporan en este documento por referencia. Estas bases de datos de dianas incluyen:

Dianas terapéuticas (<http://xin.cz3.nus.edu.sg/group/cjttd/ttd.asp>);

Citocinas y receptores de citocinas (<http://www.cytokinewebfacts.com/>, <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi>, y

[http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata/cgf/CGF\\_Database/cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/indexR.html](http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata/cgf/CGF_Database/cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/indexR.html));

Quimiocinas (<http://cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/CK/Chemokine.html>);

Receptores de quimiocinas y GPCRs (<http://csp.medic.kumamoto-u.ac.jp/CSP/Receptor.html>, <http://www.gpcr.org/7tm/>);

Receptores olfativos (<http://senselab.med.yale.edu/senselab/ORDB/default.asp>);

Receptores (<http://www.iuphar-db.org/iuphar-rd/list/index.htm>);

Dianas del cáncer (<http://cged.hgc.jp/cgi-bin/input.cgi>);

Proteínas secretadas como dianas de anticuerpos potenciales (<http://spd.cbi.pku.edu.cn/>);

Proteínas cinasas (<http://spd.cbi.pku.edu.cn/>), y

Marcadores CD humanos ([http://content.labvelocity.com/tools/6/1226/CD\\_table\\_final\\_locked.pdf](http://content.labvelocity.com/tools/6/1226/CD_table_final_locked.pdf)) y (Zola et al.,



"CD molecules 2005: human cell differentiation molecules", *Blood*, 106: 3123-3126 (2005)).

Las DVD-IgS son útiles como agentes terapéuticos para bloquear simultáneamente dos o más dianas diferentes, es decir, IL-1 $\beta$  humana y uno o varios otros antígenos diana que no son IL-1 $\beta$ , para mejorar la eficacia/seguridad y/o aumentar la protección del paciente. Tales dianas pueden incluir dianas solubles (TNF) y dianas de receptores de la superficie celular (VEGFR y EGFR).

Además, las DVD-IgS de la invención se pueden emplear para la entrega específica de tejido (la diana es un marcador de tejido y un mediador de la enfermedad para mejorar la PK local de este modo una mayor eficacia y/o menor toxicidad), incluyendo el suministro intracelular (direccionamiento a un receptor de internalización y una molécula intracelular), entregando dentro del cerebro (direccionamiento a un receptor de transferrina y un mediador de una enfermedad del SNC para atravesar la barrera hematoencefálica). La DVD-Ig también puede servir como una proteína portadora para entregar un antígeno en una ubicación específica mediante la unión a un epítipo no neutralizante de ese antígeno y también para aumentar la semivida del antígeno. Además, la DVD-Ig se puede diseñar para estar ligada físicamente a dispositivos médicos implantados en pacientes o para dirigirse a estos dispositivos médicos (véase, Burke et al., "Zotarolimus eluting stents", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 58(3): 437-446 (2006); Hildebrand et al., "Surface coatings for biological activation and functionalization of medical devices", *Surface and Coatings Technology*, 200(22-23): 6318-6324 (2006); Wu et al., "Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis", *Biomaterials*, 27: 2450-2467 (2006); Marques et al., "Mediation of the Cytokine Network in the Implantation of Orthopedic Devices", capítulo 21, En *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, (Reis et al., compiladores) (CRC Press LLC, Boca Raton, 2005) pp. 377-397). Brevemente, dirigir los tipos adecuados de células al sitio de un implante médico puede favorecer la curación y la restauración de la función del tejido normal. Alternativamente, también se proporciona la inhibición de mediadores (incluyendo pero no limitados a las citocinas), liberados después de la implantación del dispositivo mediante una DVD-Ig acoplada a un dispositivo o que se dirigen a un dispositivo. Por ejemplo, las endoprótesis vasculares se han utilizado durante años en cardiología intervencionista para despejar las arterias bloqueadas y para mejorar el flujo de la sangre hacia el músculo cardíaco. Sin embargo, se conoce que las endoprótesis vasculares metálicas tradicionales causan reestenosis (reestrechamiento de la arteria en una zona tratada) en algunos pacientes y pueden conducir a la formación de coágulos de sangre. Recientemente, se ha descrito que una endoprótesis vascular recubierta con anticuerpo anti-CD34 reduce la reestenosis y evita que se formen coágulos de sangre mediante la captura de células progenitoras endoteliales (EPC) que circulan por la sangre. Las células endoteliales son las células que revisten los vasos sanguíneos, permitiendo que la sangre fluya suavemente. Las EPCs se adhieren a la superficie dura de la endoprótesis vascular formando una capa lisa, que no solo favorece la curación, sino que impide la reestenosis y los coágulos de sangre, complicaciones previamente asociadas con el uso de endoprótesis vasculares (Aoki et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 45(10): 1574-1579 (2005)). Además de mejorar los resultados para los pacientes que requieren endoprótesis vasculares, también hay implicaciones para pacientes que requieren cirugía de derivación cardiovascular. Por ejemplo, un conducto vascular protésico (arteria artificial) recubierto con anticuerpos anti-EPC eliminaría la necesidad de utilizar arterias de las piernas o los brazos del paciente para injertos de cirugía de derivación. Esto reduciría los tiempos de cirugía y anestesia, lo que a su vez reduce las muertes por cirugía coronaria. Las DVD-IgS están diseñadas de tal manera que se unen a un marcador de la superficie celular (por ejemplo, CD34), así como a una proteína (o un epítipo de cualquier tipo, incluyendo pero no limitados a proteínas, lípidos y polisacáridos) con la que se ha recubierto el dispositivo implantado para facilitar el reclutamiento de células. Tales enfoques también se pueden aplicar a otros implantes médicos en general. Alternativamente, las DVD-IgS pueden recubrir dispositivos médicos y después de la implantación y la liberación de todas las DVDs desde el dispositivo (o cualquier otra necesidad que pueda requerir DVD-Ig adicionales de nuevo aporte, incluyendo el envejecimiento y la desnaturalización de una DVD-Ig ya cargada), el dispositivo se podría recargar mediante la administración sistémica de DVD-Ig de nuevo aporte al paciente, en donde la DVD-Ig está diseñada para unirse a una diana de interés (una citocina, un marcador de superficie celular (por ejemplo, CD34), etc.) con un conjunto de sitios de unión, y a una diana que recubre el dispositivo (incluyendo una proteína, un epítipo de cualquier tipo, incluyendo pero no limitados a lípidos, polisacáridos y polímeros) con el otro. Esta tecnología tiene la ventaja de extender la utilidad de los implantes recubiertos.

#### **A. Uso de DVD-IgS en diversas enfermedades**

Las moléculas DVD-Ig de la invención también son útiles como moléculas terapéuticas para el tratamiento de diversas enfermedades. Tales moléculas DVD se pueden unir a una o varias dianas implicadas en una enfermedad específica. Ejemplos de tales dianas en diversas enfermedades se describen a continuación.

Respuesta autoinmune e inflamatoria humana

En un aspecto, una proteína de unión DVD-Ig de la invención es capaz de unirse a IL-1 $\beta$  humana y a uno o varios antígenos que han sido implicados en respuestas autoinmunes e inflamatorias generales, que incluyen C5, CCL1 (I-309), CCL11 (eotaxina), CCL13 (mcp-4), CCL15 (MIP-1d), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19, CCL2 (mcp-1), CCL20 (MIP-3a), CCL21 (MIP-2), CCL23 (MPIF-1), CCL24 (MPIF-2 / eotaxina-2), CCL25 (TECK), CCL26, CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (RANTES), CCL7 (mcp-3), CCL8 (mcp-2), CXCL1, CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC / IP-9), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL14, CXCL2, CXCL3, CXCL5 (ENA-78 / LIX), CXCL6 (GCP-2), CXCL9, IL13, IL8, CCL13 (mcp-4), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CX3CR1,

5 IL8RA, XCR1 (CCXCR1), IFNA2, IL10, IL13, IL17C, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, IL1F9, IL22, IL5,  
 10 IL8, IL9, LTA, LTB, MIF, SCYE1 (citocina que activa monocitos endoteliales), SPP1, TNF, TNFSF5, IFNA2, IL10RA,  
 LTB4R, TOLLIP, FADD, IRAK1, IRAK2, MYD88, NCK2, TNFAIP3, TRADD, TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRAF5,  
 15 TRAF6, ACVR1, ACVR1B, ACVR2, ACVR2B, ACVRL1, CD28, CD3E, CD3G, CD3Z, CD69, CD80, CD86, CNR1,  
 CTLA4, CYSLTR1, FCER1A, FCER2, FCGR3A, GPR44, HAVCR2, OPRD1, P2RX7, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5,  
 TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, BLR1, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL15,  
 CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4,  
 20 CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CX3CL1, CX3CR1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL10,  
 CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCR4, GPR2, SCYE1, SDF2, XCL1, XCL2, XCR1, AMH, AMHR2, BMPR1A,  
 BMPR1B, BMPR2, C19orf10 (IL27w), CER1, CSF1, CSF2, CSF3, DKFZp451J0118, FGF2, GF11, IFNA1, IFNB1,  
 IFNG, IGF1, IL1A, IL1B, IL1R1, IL1R2, IL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3, IL4, IL4R, IL5, IL5RA, IL6, IL6R, IL6ST, IL7,  
 25 IL8, IL8RA, IL8RB, IL9, IL9R, IL10, IL10RA, IL10RB, IL11, IL11RA, IL12A, IL12B, IL12RB2, IL13, IL13RA1,  
 IL13RA2, IL15, IL15RA, IL16, IL17, IL17R, IL18, IL18R1, IL19, IL20, KITLG, LEP, LTA, LTB, LTB4R, LTB4R2, LTBR,  
 30 MIF, NPPB, PDGFB, TBX21, TDGF1, TGFA, TGFB1, TGFB1I1, TGFB2, TGFB3, TGFB3, TGFB3I, TGFB3R1, TGFB3R2,  
 TGFB3R3, TH1L, TNF, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF7, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFRSF11A, TNFRSF21,  
 TNFSF4, TNFSF5, TNFSF6, TNFSF11, VEGF, ZFPM2 y RNF110 (ZNF144).

### Asma

20 El asma alérgica se caracteriza por la presencia de eosinofilia, metaplasia de células calciformes, alteraciones de  
 células epiteliales, hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) y expresión de las citocinas Th2 y Th1, así como  
 niveles de IgE elevados en suero. En la actualidad se acepta en general que la inflamación de las vías respiratorias  
 es el factor clave que subyace en la patogénesis del asma, que implica una compleja interacción de células  
 25 inflamatorias tales como linfocitos T, linfocitos B, eosinófilos, mastocitos y macrófagos y sus mediadores secretados  
 que incluyen citocinas y quimiocinas. Los corticosteroides son el tratamiento antiinflamatorio más importante del  
 asma hoy en día, sin embargo, su mecanismo de acción no es específico y existen problemas de seguridad,  
 especialmente en la población de pacientes juveniles. Por lo tanto, está justificado el desarrollo de terapias más  
 específicas y selectivas.

30 Los modelos animales tales como el modelo en ratón de asma inducida por OVA, en donde se puede evaluar tanto  
 la inflamación como la AHR, son conocidos en la técnica y se pueden emplear para determinar la capacidad de  
 diversas moléculas DVD-Ig para tratar el asma. Los modelos animales para el estudio del asma se describen en  
 Coffman et al., J. Exp. Med., 201(12): 1875-1879 (2005); Lloyd et al., Adv. Immunod., 77: 263-295 (2001); Boyce et  
 al., J. Exp. Med., 201(12): 1869-1873 (2005); y Snibson et al., Clin. Exp. Allergy, 35(2): 146-152 (2005). Además de  
 las evaluaciones de seguridad de rutina de estas parejas de dianas, pruebas específicas para el grado de  
 35 inmunosupresión pueden estar justificadas y ser útiles en la selección de las mejores parejas de dianas (véase,  
 Luster et al., Toxicology, 92(1-3): 229-243 (1994); Descotes, J., Develop. Biol. Standard., 77: 99-102 (1992); Hart et  
 al., J. Allergy Clin. Immunol., 108(2): 250-257 (2001)).

40 Un aspecto de la invención se refiere a moléculas DVD-Ig capaces de unirse a IL-1 $\beta$  y a una o varias dianas, por  
 ejemplo, dos, seleccionadas entre el grupo que consiste en IL-4, IL-5, IL-8, IL-9, IL-13, IL-18, IL-5R( $\alpha$ ), TNFSF4, IL-  
 4R( $\alpha$ ), interferón  $\alpha$ , eotaxina, TSLP, PAR-2, PGD2 e IgE. Una realización incluye una DVD-Ig doblemente específica  
 anti-IL-1 $\beta$ /IL-1 $\alpha$  como un agente terapéutico beneficioso para el tratamiento del asma.

### Artritis reumatoide (AR)

45 La artritis reumatoide (AR), una enfermedad sistémica, se caracteriza por una reacción inflamatoria crónica en la  
 membrana sinovial de las articulaciones y se asocia con una degeneración del cartílago y erosión del hueso  
 yuxtaarticular. Muchas citocinas proinflamatorias, incluyendo TNF, quimiocinas y factores de crecimiento se  
 expresan en las articulaciones enfermas. La administración sistémica de un anticuerpo anti-TNF o una proteína de  
 fusión sTNFR a modelos de ratón de AR, ha mostrado que es antiinflamatoria y que protege la articulación. Varias  
 citocinas, incluidas IL-1 $\beta$ , se han implicado en la AR. Investigaciones clínicas en las que la actividad de TNF en  
 50 pacientes con AR estaba bloqueada con infliximab administrado por vía intravenosa (Harriman et al., "Summary of  
 clinical trials in rheumatoid arthritis using infliximab, an anti-TNFalpha treatment", Ann. Rheum. Dis., 58 (Supl 1): I61-  
 I64 (1999)), un AcMo quimérico anti-TNF, evidencian que TNF regula la producción de IL-6, IL-8, MCP-1 y VEGF, el  
 reclutamiento de células inmunes e inflamatorias en las articulaciones, la angiogénesis y la reducción de los niveles  
 sanguíneos de metaloproteinasas de matriz 1 y 3. Una mejor comprensión de la vía inflamatoria en la artritis  
 reumatoide ha llevado a la identificación de otras dianas terapéuticas implicadas en la artritis reumatoide.  
 55 Tratamientos prometedores, tales como antagonistas de interleucina-6 (MRA anticuerpo del receptor de IL-6,  
 desarrollado por Chugai, Roche (véase, Nishimoto et al., Arthritis Rheum., 50(6): 1761-1769 (2004)), CTLA4Ig  
 (abatacept, Genovese et al., "Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition",  
 N. Engl. J. Med., 353: 1114-1123 (2005)) y la terapia con anti-linfocitos B (rituximab, Okamoto et al., "Rituximab for  
 rheumatoid arthritis", N. Engl. J. Med., 351: 1909 (2004)) ya se han probado en ensayos controlados aleatorios  
 60 durante el año pasado. IL-1 $\beta$  y otras citocinas, tales como IL-15 e IL-18, han sido identificadas por tener un papel  
 utilizando modelos animales de AR (anticuerpo terapéutico HuMax-IL\_15, AMG 714 véase, Baslund et al., Arthritis  
 Rheum., 52(9): 2686-2692 (2005)). Una terapia con anticuerpos específicos dobles, combinando anti-TNF y otro

mediador, como IL-1 $\beta$ , tiene un gran potencial en la mejora de la eficacia clínica y/o la protección del paciente. Por ejemplo, el bloqueo de TNF y VEGF puede erradicar potencialmente la inflamación y la angiogénesis, en donde ambas están involucradas en la fisiopatología de la AR. Se contempla una proteína de unión DVD-Ig capaz de bloquear IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Además de las evaluaciones de seguridad de rutina de estas parejas de dianas, pruebas específicas para el grado de inmunosupresión pueden estar justificadas y ser útiles en la selección de las mejores parejas de dianas (véase, Luster et al., *Toxicology*, 92(1-3): 229-243 (1994); Descotes et al., *Develop. Biol. Standard.*, 77: 99-102 (1992); Hart et al., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 108(2): 250-257 (2001)). Si una molécula DVD-Ig va a ser útil para el tratamiento de la artritis reumatoide, esto se puede evaluar utilizando modelos animales de AR preclínica, tales como el modelo de artritis de ratón inducida con colágeno. Otros modelos útiles también son bien conocidos en la técnica (véase, Brand, D.D., *Comp. Med.*, 55:114-122 (2005)). Basándose en la reactividad cruzada de los anticuerpos parentales para ortólogos humanos y de ratón (por ejemplo, la reactividad de TNF humano y de ratón, IL-14 humana y de ratón, etc.), estudios de validación en el modelo de CIA en ratón se pueden llevar a cabo con moléculas DVD-Ig obtenidas a partir de un "anticuerpo sustituto emparejado". Brevemente, una DVD-Ig basada en dos (o más) anticuerpos específicos de la diana de ratón, se pueden adaptar en la medida de lo posible a las características de los anticuerpos humanos parentales o humanizados utilizados para la construcción de la DVD-Ig humana (afinidad similar, potencia de neutralización similar, semivida similar, etc.).

En una realización, una DVD-Ig de la invención que se une a IL-1 $\beta$  humana y otra diana que no es IL-1 $\beta$ , también se pueden usar para tratar otras enfermedades en las que actúa IL-1 $\beta$ . Tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a SLE, esclerosis múltiple (ES), septicemia, diversas enfermedades neurológicas y cánceres (incluyendo de cuello uterino, de mama, gástrico). También se proporciona a continuación una lista más amplia de enfermedades y trastornos en los que la IL-1 $\beta$  tiene una función.

Una realización de la invención se refiere a moléculas DVD-Ig capaces de unirse a IL-1 $\beta$  humana y a una o varias dianas seleccionadas a partir del grupo que consiste en IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , IL-12, TWEAK, IL-23, CXCL13, CD40, CD40L, IL-18, VEGF, VLA-4, TNF $\beta$ , CD45RB, CD200, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, FGF, C5, CD52, esclerostina y CCR2.

#### 25 **Lupus eritematoso sistémico (SLE)**

La característica inmunopatogénica de SLE es la activación de linfocitos B policlonales, lo que conduce a una hiperglobulinemia, producción de autoanticuerpos y formación de complejo inmune. La anomalía fundamental parece ser el fracaso de los linfocitos T para suprimir los clones de linfocitos B prohibidos, debido a una mala regulación generalizada de los linfocitos T. Además, la interacción entre los linfocitos B y T se ve facilitada por varias citocinas, tales como IL-10, así como moléculas coestimuladoras, tales como CD40 y CD40L, B7 y CD28 y CTLA-4, que inician la segunda señal. Estas interacciones, junto con un aclaramiento fagocítico alterado de los complejos inmunes y el material apoptótico, perpetúan la respuesta inmune con una lesión tisular resultante.

En un aspecto, una proteína de unión DVD-Ig de la invención es capaz de unirse a IL-1 $\beta$  humana y a uno o varios de los siguientes antígenos que han sido implicados en el SLE: terapias dirigidas a linfocitos B: CD-20, CD-22, CD-19, CD28, CD4, CD80, HLA-DRA, IL10, IL2, IL4, TNFRSF5, TNFRSF6, TNFSF5, TNFSF6, BLR1, HDAC4, HDAC5, HDAC7A, HDAC9, ICOSL, IGBP1, MS4A1, RGS1, SLA2, CD81, IFNB1, IL10, TNFRSF5, TNFRSF7, TNFSF5, AICDA, BLNK, GALNAC4S-6ST, HDAC4, HDAC5, HDAC7A, HDAC9, IL10, IL11, IL4, INHA, INHBA, KLF6, TNFRSF7, CD28, CD38, CD69, CD80, CD83, CD86, DPP4, FCER2, IL2RA, TNFRSF8, TNFSF7, CD24, CD37, CD40, CD72, CD74, CD79A, CD79B, CR2, IL1R2, ITGA2, ITGA3, MS4A1, ST6GAL1, CD1C, CHST10, HLA-A, HLA-DRA y NT5E; señales coestimuladoras: CTLA4 o B7.1/B7.2; inhibición de la supervivencia de los linfocitos B: BlyS, BAFF; inactivación del complemento: C5; modulación de citocinas: el principio clave es que la respuesta biológica neta en cualquier tejido es el resultado de un equilibrio entre los niveles locales de citocinas proinflamatorias o antiinflamatorias (véase, Sfikakis et al., *Curr. Opin. Rheumatol.*, 17:550-557 (2005)). SLE se considera que es una enfermedad impulsada por Th-2 con aumentos documentados en suero de IL-4, IL-6, IL-10. Las DVD-Igs capaces de unirse a una o varias dianas seleccionadas a partir del grupo que consiste en IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\alpha$  y TNF- $\alpha$ , también se contemplan. La combinación de dianas descritas en el presente documento mejorará la eficacia terapéutica para el SLE que se puede someter a ensayo en una serie de modelos preclínicos de lupus (véase, Peng S.L., *Methods Mol. Med.*, 102: 227-272 (2004)). Basándose en la reactividad cruzada de los anticuerpos parentales para ortólogos humanos y de ratón (por ejemplo, la reactividad para CD20 humana y de ratón, interferón alfa humano y de ratón, etc.), se pueden realizar estudios de validación en un modelo de lupus de ratón con moléculas DVD-Ig obtenidas a partir de un "anticuerpo sustituto emparejado"; brevemente, dos anticuerpos específicos (o más) de dianas de ratón basados en DVD-Ig, se pueden adaptar en la medida de lo posible a las características de los anticuerpos humanos parentales o humanizados utilizados para la construcción de la DVD-Ig humana (afinidad similar, potencia de neutralización similar, semivida similar, etc.).

#### 55 **Esclerosis múltiple (EM)**

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad compleja de tipo autoinmune humana con una etiología predominantemente desconocida. La destrucción inmunológica de la proteína básica de la mielina (MBP) en todo el sistema nervioso es la principal patología de la esclerosis múltiple. La EM es una enfermedad de patologías complejas, que implica la infiltración de linfocitos T CD4+ y CD8+ y de respuesta dentro del sistema nervioso central. La expresión en el SNC de citocinas, especies de nitrógeno reactivas y moléculas coestimuladoras, todas ellas se

han descrito en la EM. De mayor consideración son los mecanismos inmunológicos que contribuyen al desarrollo de la autoinmunidad. En particular, la expresión de antígenos, interacciones entre citocinas y leucocitos, y linfocitos T reguladores, que ayudan a equilibrar/modular otros linfocitos T como las células Th1 y Th2, son áreas importantes para la identificación de una diana terapéutica.

5 La IL-12 es una citocina proinflamatoria que es producida por APC y favorece la diferenciación de células efectoras Th1. La IL-12 se produce en las lesiones en desarrollo de los pacientes con EM, así como en animales afectados por EAE. Anteriormente se había mostrado que una interferencia en las rutas de IL-12 impide eficazmente la EAE en roedores y que la neutralización *in vivo* de IL-12p40 usando un AcMo anti-IL-12 tiene efectos beneficiosos en el modelo de EAE inducida con mielina en títes comunes.

10 TWEAK es un miembro de la familia de TNF, expresada constitutivamente en el sistema nervioso central (SNC), con efectos proinflamatorios, proliferativos o apoptóticos, dependiendo de los tipos de células. Su receptor, Fn14, se expresa en el SNC en las células endoteliales, los astrocitos reactivos y las neuronas. La expresión del ARNm de TWEAK y Fn14 se incrementaba en la médula espinal durante la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). Un tratamiento con anticuerpos anti-TWEAK en la EAE inducida con glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (MOG) en ratones C57BL/6, daba como resultado una reducción de la gravedad de la enfermedad y la infiltración de leucocitos cuando los ratones se trataban después de la fase de cebado.

Un aspecto de la invención se refiere a moléculas DVD-Ig capaces de unirse a IL-1 $\beta$  y a una o varias dianas, por ejemplo dos, seleccionadas entre el grupo que consiste en IL-12, TWEAK, IL-23, CXCL13, CD40, CD40L, IL-18, VEGF, VLA-4, TNF, CD45RB, CD200, IFN $\gamma$ , GM-CSF, FGF, C5, CD52, osteopontina y CCR2. Una realización incluye una DVD-Ig doble específica anti-IL-1 $\beta$ /TWEAK como un agente terapéutico beneficioso para el tratamiento de la EM.

Varios modelos animales para evaluar la utilidad de las moléculas DVD-Ig para tratar la EM son conocidos en la técnica (véase, Steinman et al., Trends Immunol., 26(11): 565-571 (2005); Lublin et al., Springer Semin Immunopathol., 8(3): 197-208 (1985); Genain et al., J. Mol. Med., 75(3): 187-197 (1997); Tuohy et al., J. Exp. Med., 189(7): 1033-1042 (1999); Owens et al., Neurol. Clin., 13(1): 51-73 (1995); y 't Hart et al., J. Immunol., 175(7): 4761-4768 (2005)). Basándose en la reactividad cruzada de los anticuerpos parentales para ortólogos de especies humanas y animales (por ejemplo, reactividad para IL-1 $\beta$  humana y de ratón, TWEAK humana y de ratón, etc.), estudios de validación en el modelo de EAE de ratón pueden llevarse a cabo con moléculas DVD-Ig obtenidas a partir de un "anticuerpo sustituto emparejado"; brevemente, dos anticuerpos específicos (o más) de dianas de ratón basados en DVD-Ig, se pueden adaptar en la medida de lo posible a las características de los anticuerpos humanos parentales o humanizados utilizados para la construcción de la DVD-Ig humana (afinidad similar, potencia de neutralización similar, semivida similar, etc.). El mismo concepto se aplica a los modelos animales en otras especies de no roedores, en donde una DVD-Ig obtenida a partir de un "anticuerpo sustituto emparejado" se seleccionaría para estudios de farmacología anticipada y, posiblemente, de seguridad. Además de las evaluaciones de seguridad de rutina de estas parejas de dianas, pruebas específicas para el grado de inmunosupresión pueden estar justificadas y ser útiles en la selección de las mejores parejas de dianas (véase, Luster et al., Toxicology, 92(1-3): 229-243 (1994); Descotes et al., Develop. Biol. Standard., 77: 99-102 (1992); Jones, R., "Rovelizumab -ICOS Corp", IDrugs, 3(4):442-446 (2000)).

### Septicemia

40 La fisiopatología de la septicemia se inicia por los componentes de la membrana externa organismos gram-negativos (lipopolisacárido [LPS], lípido A, endotoxina) y organismos gram-positivos (ácido lipoteicoico, peptidoglicano). Estos componentes de la membrana externa son capaces de unirse al receptor de CD14 en la superficie de monocitos. En virtud de los receptores de tipo toll recientemente descritos, una señal se transmite entonces a la célula, conduciendo a la producción eventual de las citocinas proinflamatorias, factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) e interleucina-1 (IL-1). Respuestas inflamatorias e inmunes abrumadoras son características esenciales de un choque séptico y tienen un papel central en la patogénesis del daño tisular, fallo multiorgánico y muerte inducida por septicemia. Las citocinas, en especial el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleucina (IL-1), han mostrado ser mediadores decisivos en el choque séptico. Estas citocinas tienen un efecto tóxico directo sobre los tejidos; también activan la fosfolipasa A2. Estos y otros efectos conducen a un aumento de las concentraciones de factor activador de plaquetas, aumento de la actividad de la óxido nítrico sintasa, aumento de la infiltración tisular con neutrófilos y aumento de la actividad de los neutrófilos.

El tratamiento de la septicemia y el choque séptico sigue siendo un enigma clínico y los últimos ensayos prospectivos con modificadores de la respuesta biológica (es decir, anti-TNF, anti-MIF), destinados a la respuesta inflamatoria, han mostrado solo un beneficio clínico modesto. Recientemente, el interés se ha desplazado hacia las terapias dirigidas a la inversión de los períodos que acompañan a la supresión inmune. Estudios en animales de experimentación y pacientes gravemente enfermos han demostrado que el aumento de la apoptosis de los órganos linfoides y algunos tejidos del parénquima contribuye a esta supresión inmune, anergia y disfunción del sistema de órganos. Durante los síntomas de septicemia, la apoptosis de linfocitos puede estar provocada por la ausencia de IL-2 o por la liberación de glucocorticoides, granzimas o las citocinas denominadas de la "muerte": factor de necrosis tumoral alfa o ligando Fas. La apoptosis tiene lugar por medio de una autoactivación de caspasas citosólicas y/o

mitocondriales, que puede estar influenciada por los miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia Bcl-2. En animales de experimentación, no solo el tratamiento con inhibidores de la apoptosis puede prevenir la apoptosis de células linfoides; sino que también puede mejorar el resultado. Aunque los ensayos clínicos con agentes antiapoptóticos siguen estando distantes debido en gran parte a las dificultades técnicas asociadas a su administración y el direccionamiento al tejido, una inhibición de la apoptosis de linfocitos representa una diana terapéutica atractiva para el paciente séptico. Del mismo modo, un agente de doble especificidad dirigido tanto al mediador inflamatorio como al mediador de la apoptosis, puede tener un beneficio añadido. Un aspecto de la invención se refiere a DVD-Igs capaces de unirse a IL-1 $\beta$  y a una o varias dianas implicadas en la septicemia, seleccionadas a partir del grupo que consiste en TNF, IL-1, MIF, IL-6, IL-8, IL-18, IL-12, IL-23, FasL, LPS, receptores de tipo Toll, TLR-4, factor tisular, MIP-2, ADORA2A, CASP1, CASP4, IL-10, IL-1B, NFKB1, PROC, TNFRSF1A, CSF3, CCR3, IL-1RN, MIF, NFKB1, PTAFR, TLR2, TLR4, GPR44, HMOX1, HMG-B1, midkina, IRAK1, NFKB2, SERPINA1, SERPINE1 y TREM1. La eficacia de tales DVD-Igs en la septicemia se puede evaluar en modelos animales preclínicos conocidos en la técnica (véase, Buras et al., *Nat. Rev. Drug Discov.*, 4(10): 854-865 (2005); y Calandra et al., *Nature Med.*, 6(2):164-170 (2000)).

### 15 **Trastornos neurológicos y enfermedades neurodegenerativas**

Las enfermedades neurodegenerativas son crónicas, en cuyo caso son por lo general dependientes de la edad, o agudas (por ejemplo, apoplejía, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, etc.). Se caracterizan por una pérdida progresiva de las funciones neuronales (muerte celular neuronal, desmielinización), pérdida de movilidad y pérdida de memoria. Un conocimiento emergente de los mecanismos subyacentes de las enfermedades neurodegenerativas crónicas (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, AD) muestra una etiología compleja y una variedad de factores han sido reconocidos por contribuir a su desarrollo y progresión, por ejemplo, la edad, el estado glucémico, la producción de amiloide y multimerización, la acumulación de productos avanzados finales de la glicación (AGE) que se unen a su receptor RAGE (receptor para AGE), un aumento del estrés oxidativo del cerebro, una disminución del flujo sanguíneo cerebral, la neuroinflamación que incluye la liberación de citocinas y quimiocinas inflamatorias, una disfunción neuronal y activación microglial. Por lo tanto, estas enfermedades neurodegenerativas crónicas representan una interacción compleja entre múltiples tipos de células y mediadores. Las estrategias del tratamiento de tales enfermedades son limitadas y en su mayoría constituyen un bloqueo de los procesos inflamatorios con agentes antiinflamatorios no específicos (por ejemplo, corticosteroides, inhibidores de COX) o agentes para evitar la pérdida de neuronas y/o funciones sinápticas. Estos tratamientos no logran detener la progresión de la enfermedad. Estudios recientes sugieren que las terapias más dirigidas, tales como anticuerpos para el péptido A $\beta$  soluble (incluyendo las formas oligoméricas de A $\beta$ ) no solo pueden ayudar a detener la progresión de la enfermedad, sino que pueden ayudar también a conservar la memoria. Estas observaciones preliminares sugieren que terapias específicas dirigidas a más de un mediador de la enfermedad (por ejemplo, A $\beta$  y una citocina proinflamatoria tal como TNF) pueden proporcionar incluso una mejor eficacia terapéutica para las enfermedades neurodegenerativas crónicas que las observadas con el direccionamiento a un solo mecanismo de la enfermedad (por ejemplo, solamente A $\beta$  soluble) (véase, Shepherd et al., *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 31: 503-511(2005); Nelson, R.B., *Curr. Pharm. Des.*, 11: 3335-3352 (2005); Klein, W.L., *Neurochem. Int.*, 41: 345-352 (2002); Janelins et al., "Early correlation of microglial activation with enhanced tumor necrosis factor-alpha and monocyte chemoattractant protein-1 expression specifically within the entorhinal cortex of triple transgenic Alzheimer's disease mice", *J. Neuroinflammation*, 2(23): 1-12 (2005); Soloman, B., *Curr. Alzheimer. Res.*, 1: 149-163 (2004); Klyubin et al., *Nature Med.*, 11:556-561 (2005); Arancio et al., *EMBO J.*, 23: 4096-4105 (2004); Bornemann et al., *Am. J. Pathol.*, 158: 63-73 (2001); Deane et al., *Nature Med.*, 9: 907-913 (2003); y Masliah et al., *Neuron*, 46: 857-868 (2005)).

Las moléculas DVD-Ig de la invención pueden unirse a IL-1 $\beta$  y a una o varias dianas implicadas en enfermedades neurodegenerativas crónicas, tales como la enfermedad de Alzheimer. Estas dianas incluyen, pero no se limitan a, cualquier mediador, superficie soluble o celular, implicada en la patogénesis de AD, por ejemplo, AGE (S100 A, anfotericina), citocinas proinflamatorias (por ejemplo, IL-1), quimiocinas (por ejemplo, MCP 1), moléculas que inhiben la regeneración nerviosa (por ejemplo, Nogo, RGM A), moléculas que mejoran el crecimiento de las neuritas (neurotrofinas) y moléculas que pueden mediar en el transporte a través de la barrera hematoencefálica (por ejemplo, receptor de transferrina, receptor de insulina o RAGE). La eficacia de las moléculas DVD-Ig se puede validar en modelos animales preclínicos, tales como los ratones transgénicos que hiperexpresan la proteína precursora de amiloide o RAGE y desarrollan síntomas similares a la enfermedad de Alzheimer. Además, las moléculas DVD-Ig se pueden construir y analizar la eficacia en los modelos animales y la mejor DVD-Ig terapéutica se puede seleccionar para pruebas en pacientes humanos. Las moléculas DVD-Ig también se pueden emplear para el tratamiento de otras enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson. La alfa-sinucleína está implicada en la patología del Parkinson. Una DVD-Ig capaz de dirigirse a IL-1 $\beta$  y LINGO-1, alfa-sinucleína, y/o mediadores inflamatorios tales como TNF, IL-17, MCP-1, puede demostrar que es una terapia eficaz para la enfermedad de Parkinson y se contempla en la invención.

### **Regeneración neuronal y lesión de la médula espinal**

60 A pesar del aumento de los conocimientos de los mecanismos patológicos, la lesión de la médula espinal (SCI) es todavía una afección devastadora y representa una indicación médica caracterizada por una alta asistencia médica. La mayoría de las lesiones de la médula espinal son lesiones por contusión o compresión y la lesión primaria viene

seguida generalmente por mecanismos de lesión secundarios (mediadores de la inflamación, por ejemplo, citocinas y quimiocinas) que empeoran la lesión inicial y producen una ampliación significativa de la zona de la lesión, a veces más de 10 veces. Estos mecanismos primarios y secundarios en la SCI son muy similares a los de la lesión cerebral causada por otros medios, por ejemplo, apoplejía. No existe un tratamiento satisfactorio y una inyección en bolo de dosis altas de metilprednisolona (MP) es la única terapia utilizada dentro de una estrecha ventana de tiempo de 8 horas después de la lesión. Este tratamiento, sin embargo, solo pretende evitar una lesión secundaria sin causar ninguna recuperación funcional significativa. Está fuertemente criticado por la falta de eficacia inequívoca y efectos adversos graves, como la inmunosupresión con infecciones posteriores y alteraciones histopatológicas musculares graves. Ningún otro fármaco, producto biológico o molécula pequeña, que estimule el potencial de regeneración endógena ha sido aprobado, pero unos principios de tratamiento prometedores y fármacos candidatos han mostrado una eficacia en modelos animales de SCI en los últimos años. En gran medida, la falta de recuperación funcional en la SCI humana se debe a factores que inhiben el crecimiento de las neuritas, en sitios de lesión, en el tejido de la cicatriz, en la mielina, así como en las células asociadas a las lesiones. Tales factores son las proteínas asociadas con la mielina NogoA, OMgp y MAG, RGM A, CSPG asociado a cicatrices (proteoglicanos de sulfato de condroitina) y factores inhibidores sobre astrocitos reactivos (algunas semaforinas y efrinas). Sin embargo, en el sitio de la lesión no solo se encuentran moléculas inhibitoras del crecimiento sino también factores estimulantes del crecimiento de neuritas, como neurotrofinas, laminina, L1 y otras. Este conjunto de moléculas inhibitoras del crecimiento de neuritas y estimuladoras del crecimiento puede explicar que el bloqueo de factores individuales, como NogoA o RGM A, den como resultado una recuperación funcional significativa en modelos de SCI en roedores, porque una reducción de las influencias inhibitoras podría desplazar el equilibrio desde una inhibición del crecimiento a favorecer el crecimiento. Sin embargo, las recuperaciones observadas con el bloqueo de una sola molécula inhibitora del crecimiento de neuritas no eran completas. Para lograr recuperaciones más rápidas y más pronunciadas, el bloqueo de dos moléculas inhibitoras del crecimiento neurítico, por ejemplo, Nogo y RGM A, o el bloqueo de una molécula inhibitora del crecimiento de neuritas y la mejora de las funciones de una molécula que favorece el crecimiento de neuritas, por ejemplo, Nogo y neurotrofinas, o el bloqueo de una molécula inhibitora del crecimiento de neuritas, por ejemplo, Nogo y una molécula proinflamatoria, por ejemplo, TNF, puede ser deseable (véase, McGee et al., *Trends Neurosci.*, 26: 193-198 (2003); Domeniconi et al., *J. Neurol. Sci.*, 233: 43-47 (2005); Makwana et al., *FEBS J.*, 272: 2628-2638 (2005); Dickson, B.J., *Science*, 298: 1959-1964 (2002); Teng et al., *J. Neurosci. Res.*, 79: 273-278 (2005); Karnezis et al., *Nature Neurosci.*, 7: 736 (2004); Xu et al., *J. Neurochem.*, 91: 1018-1023 (2004)).

En un aspecto, una DVD-Ig humana que se une a IL-1 $\beta$  humana también se puede unir a una o a ambas de las parejas de dianas tales como NgR y RGM A; NogoA y RGM A; MAG y RGM A; OMgp y RGM A; RGM A y RGM B; CSPGs y RGM A; agregano, midkina, neurocano, versicano, fosfacano, Te38 y TNF- $\alpha$ ; se proporcionan anticuerpos específicos de globulímero A $\beta$  combinados con anticuerpos que favorecen el brote de dendritas y axones. La patología de las dendritas es un signo muy temprano de la EA y se sabe que NOGO A restringe el crecimiento de las dendritas. Se puede combinar este tipo de ab con cualquiera de los anticuerpos candidatos de SCI (proteínas de mielina). Otras dianas de DVD-Ig pueden incluir cualquier combinación de NgR-p75, NgR-Troy, NgR-Nogo66 (Nogo), NgR-Lingo, Lingo-Troy, Lingo-p75, MAG u OMgp. Además, las dianas también pueden incluir cualquier mediador, superficie soluble o celular, implicada en la inhibición de las neuritas, por ejemplo, Nogo, OMgp, MAG, RGM A, semaforinas, efrinas, A $\beta$  soluble, citocinas proinflamatorias (por ejemplo, IL-1), quimiocinas (por ejemplo, MIP 1a), moléculas que inhiben la regeneración nerviosa. La eficacia de moléculas DVD-Ig anti-nogo/anti-RGM A o similares se puede validar en modelos animales preclínicos de lesión de la médula espinal. Además, estas moléculas DVD-Ig se pueden construir y analizar su eficacia en los modelos animales y la mejor DVD-Ig terapéutica se puede seleccionar para las pruebas en pacientes humanos. Además, las moléculas DVD-Ig pueden construirse de modo que se dirijan a dos sitios de unión en ligandos distintos sobre un único receptor, por ejemplo, el receptor de Nogo que se une a tres ligandos Nogo, OMgp y MAG, y RAGE que se une a A $\beta$  y S100 A. Además, los inhibidores del crecimiento neurítico por ejemplo, nogo y el receptor de nogo, también desempeñan un papel en la prevención de la regeneración nerviosa en enfermedades inmunológicas como la esclerosis múltiple. La inhibición de la interacción entre nogo-receptor de nogo ha mostrado que mejora la recuperación en modelos animales de esclerosis múltiple. Por lo tanto, las moléculas DVD-Ig que pueden bloquear la función de un mediador inmune, por ejemplo, una citocina como IL-12 y una molécula inhibitora del crecimiento neurítico, por ejemplo, Nogo o RGM, pueden ofrecer una eficacia más rápida y mayor que el bloqueo de solo una molécula inmune o inhibitora del crecimiento de neuritas.

En general, los anticuerpos no atraviesan la barrera hematoencefálica (BBB) de una manera eficaz y relevante. Sin embargo, en ciertas enfermedades neurológicas, por ejemplo, apoplejía, lesión cerebral traumática, esclerosis múltiple, etc., la BBB puede estar alterada y permite una mayor penetración de DVD-Igs y anticuerpos en el cerebro. En otras afecciones neurológicas, en las que no tienen lugar fugas en la BBB, se puede emplear el direccionamiento de sistemas de transporte endógenos, incluyendo transportadores mediados por vehículos, tales como vehículos de glucosa y de aminoácidos y estructuras/receptores celulares que median en la transcitosis mediada por receptores en el endotelio vascular de la BBB, lo que permite el transporte a través de la BBB de la DVD-Ig. Estructuras en la BBB que permiten este tipo de transporte incluyen, pero no se limitan al receptor de insulina, receptor de transferrina, LRP y RAGE. Además, existen estrategias que permiten el uso de DVD-Igs también como lanzaderas para el transporte de fármacos potenciales en el SNC, incluyendo fármacos de bajo peso molecular, nanopartículas y ácidos nucleicos (Coloma et al., *Pharm. Res.*, 17(3):266-274 (2000); Boado et al., *Bioconjug. Chem.*, 18(2):447-455

(2007)).

### Trastornos oncológicos

La terapia con anticuerpos monoclonales se ha convertido en una modalidad terapéutica importante contra el cáncer (von Mehren et al., Ann. Rev. Med., 54: 343-369 (2003)). Los anticuerpos pueden ejercer efectos antitumorales mediante la inducción de apoptosis, citotoxicidad redirigida, interfiriendo con las interacciones ligando-receptor o evitando la expresión de proteínas que son decisivas para el fenotipo neoplásico. Además, los anticuerpos pueden dirigirse a componentes del microentorno del tumor, alterando las estructuras vitales, tales como la formación de una vascularización asociada a tumores. Los anticuerpos también pueden dirigirse a receptores cuyos ligandos son factores de crecimiento, tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico. Así pues, el anticuerpo inhibe que ligandos naturales que estimulan el crecimiento celular se unan a células tumorales específicas. Alternativamente, los anticuerpos pueden inducir una red anti-idiotipo, citotoxicidad mediada por el complemento o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). El uso de un anticuerpo de doble especificidad que se dirige a dos mediadores tumorales distintos probablemente será un beneficio adicional en comparación con una terapia monoespecífica.

En otra realización, una DVD-Ig que se une a IL-1 $\beta$  humana de la invención también puede ser capaz de unirse a otra diana implicada en enfermedades oncológicas incluyendo, pero no limitadas a: IGF1R, IGF, VEGFR1, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ , IGF1,2, ERB3, CDCP, 1BSG2, ErbB3, CD52, CD20, CD19, CD3, CD4, CD8, BMP6, IL12A, IL1A, IL1B, IL2, IL24, INHA, TNF, TNFSF10, BMP6, EGF, FGF1, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF2, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, GRP, IGF1, IGF2, IL12A, IL1A, IL1B, IL2, INHA, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, VEGF, CDK2, FGF10, FGF18, FGF2, FGF4, FGF7, IGF1R, IL2, BCL2, CD164, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C, CDKN3, GNRH1, IGFBP6, IL1A, IL1B, ODZ1, PAWR, PLG, TGFB11, AR, BRCA1, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK9, E2F1, EGFR, ENO1, ERBB2, ESR1, ESR2, IGFBP3, IGFBP6, IL2, INSL4, MYC, NOX5, NR6A1, PAP, PCNA, PRKCQ, PRKD1, PRL, TP53, FGF22, FGF23, FGF9, IGFBP3, IL2, INHA, KLK6, TP53, CHGB, GNRH1, IGF1, IGF2, INHA, INSL3, INSL4, PRL, KLK6, SHBG, NR1D1, NR1H3, NR1I3, NR2F6, NR4A3, ESR1, ESR2, NR0B1, NR0B2, NR1D2, NR1H2, NR1H4, NR1I2, NR2C1, NR2C2, NR2E1, NR2E3, NR2F1, NR2F2, NR3C1, NR3C2, NR4A1, NR4A2, NR5A1, NR5A2, NR6A1, PGR, RARB, FGF1, FGF2, FGF6, KLK3, KRT1, APOC1, BRCA1, CHGA, CHGB, CLU, COL1A1, COL6A1, EGF, ERBB2, ERK8, FGF1, FGF10, FGF11, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF2, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, GNRH1, IGF1, IGF2, IGFBP3, IGFBP6, IL12A, IL1A, IL1B, IL2, IL24, INHA, INSL3, INSL4, KLK10, KLK12, KLK13, KLK14, KLK15, KLK3, KLK4, KLK5, KLK6, KLK9, MMP2, MMP9, MSMB, NTN4, ODZ1, PAP, PLAU, PRL, PSAP, SERPINA3, SHBG, TGFA, TIMP3, CD44, CDH1, CDH10, CDH19, CDH20, CDH7, CDH9, CDH1, CDH10, CDH13, CDH18, CDH19, CDH20, CDH7, CDH8, CDH9, ROBO2, CD44, ILK, ITGA1, APC, CD164, COL6A1, MTSS1, PAP, TGFB11, AGR2, AIG1, AKAP1, AKAP2, CANT1, CAV1, CDH12, CLDN3, CLN3, CYB5, CYC1, DAB2IP, DES, DNCL1, ELAC2, ENO2, ENO3, FASN, FLJ12584, FLJ25530, GAGEB1, GAGEC1, GGT1, GSTP1, HIP1, HUMCYT2A, IL29, K6HF, KAI1, KRT2A, MIB1, PART1, PATE, PCA3, PIAS2, PIK3CG, PPID, PR1, PSCA, SLC2A2, SLC33A1, SLC43A1, STEAP, STEAP2, TPM1, TPM2, TRPC6, ANGPT1, ANGPT2, ANPEP, ECGF1, EREG, FGF1, FGF2, FIGF, FLT1, JAG1, KDR, LAMA5, NRP1, NRP2, PGF, PLXDC1, STAB1, VEGF, VEGFC, ANGPTL3, BAI1, COL4A3, IL8, LAMA5, NRP1, NRP2, STAB1, ANGPTL4, PECAM1, PF4, PROK2, SERPINF1, TNFAIP2, CCL11, CCL2, CXCL1, CXCL10, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL9, IFNA1, IFNB1, IFNG, IL1B, IL6, MDK, EDG1, EFNA1, EFNA3, EFNB2, EGF, EPHB4, FGFR3, HGF, IGF1, ITGB3, PDGFA, TEK, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, CCL2, CDH5, COL18A1, EDG1, ENG, ITGAV, ITGB3, THBS1, THBS2, BAD, BAG1, BCL2, CCNA1, CCNA2, CCND1, CCNE1, CCNE2, CDH1 (E-caderina), CDKN1B (p27Kip1), CDKN2A (p16INK4a), COL6A1, CTNNB1 (b-catenina), CTSB (cathepsina B), ERBB2 (Her-2), ESR1, ESR2, F3 (TF), FOSL1 (FRA-1), GATA3, GSN (Gelsolina), IGFBP2, IL2RA, IL6, IL6R, IL6ST (glicoproteína 130), ITGA6 (integrina  $\alpha$ 6), JUN, KLK5, KRT19, MAP2K7 (c-Jun), MKI67 (Ki-67), NGFB (NGF), NGFR, NME1 (NM23A), PGR, PLAU (uPA), PTEN, SERPINB5 (maspina), SERPINE1 (PAI-1), TGFA, THBS1 (trombospondina-1), TIE (Tie-1), TNFRSF6 (Fas), TNFSF6 (FasL), TOP2A (topoisomerasa II), TP53, AZGP1 (zinc-a-glicoproteína), BPAG1 (plectina), CDKN1A (p21Wap1/Cip1), CLDN7 (claudina-7), CLU (clusterina), ERBB2 (Her-2), FGF1, FLRT1 (fibronectina), GABRP (GABA $\alpha$ ), GNAS1, ID2, ITGA6 (integrina  $\alpha$ 6), ITGB4 (integrina  $\beta$ 4), KLF5 (GC Box BP), KRT19 (queratina 19), KRTHB6 (queratina de tipo II específica del cabello), MACMARCKS, MT3 (metalotionectina-III), MUC1 (mucina), PTGS2 (COX-2), RAC2 (p21Rac2), S100A2, SCGB1D2 (lipofilina B), SCGB2A1 (mamaglobina 2), SCGB2A2 (mamaglobina 1), SPRR1B (Spr1), THBS1, THBS2, THBS4 y TNFAIP2 (B94), RON, c-Met, CD64, DLL4, PLGF, CTLA4, fosfatidilserina, ROBO4, CD80, CD22, CD40, CD23, CD28, CD55, CD38, CD70, CD74, CD30, CD138, CD56, CD33, CD2, CD137, DR4, DR5, RANKL, VEGFR2, PDGFR, VEGFR1, MTSP1, MSP, EPHB2, EPHA1, EPHA2, EpCAM, PGE2, NKG2D, LPA, SIP, APRIL, BCMA, MAPG, FLT3, PDGFR alfa, PDGFR beta, ROR1, PSMA, PSCA, SCD1 y CD59.

### D. Composiciones farmacéuticas

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo (incluyendo una DVD-Ig descrita en el presente documento), o una porción del mismo que se une a antígeno, de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos de la invención son para uso, pero no limitado a, en el diagnóstico, la detección o el seguimiento de un trastorno, en la prevención, el tratamiento, la gestión o la mejora de un trastorno o uno o varios síntomas del mismo, y/o en

investigación. En una realización específica, una composición comprende uno o varios anticuerpos de la invención. En otra realización, la composición farmacéutica comprende uno o varios anticuerpos de la invención y uno o varios agentes profilácticos o terapéuticos distintos de los anticuerpos de la invención, para el tratamiento de un trastorno en el que la actividad de IL-1 $\beta$  es perjudicial. En una realización, los agentes profilácticos o terapéuticos son conocidos por ser útiles o porque se han utilizado o se emplean actualmente en la prevención, el tratamiento, la gestión o la mejora de un trastorno o uno o varios síntomas del mismo. De acuerdo con estas realizaciones, la composición puede comprender, además un vehículo, un diluyente o un excipiente.

Los anticuerpos y las porciones de anticuerpo de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto. Normalmente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal y como se usa en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o varios entre agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro sódico en la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la vida útil o la eficacia del anticuerpo o de la porción de anticuerpo.

Se conocen varios sistemas de entrega y se pueden utilizar para administrar uno o varios anticuerpos de la invención o la combinación de uno o varios anticuerpos de la invención y un agente profiláctico o un agente terapéutico útil para prevenir, gestionar, tratar o mejorar un trastorno o uno o varios síntomas del mismo, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, J. Biol. Chem., 262: 4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral o de otro tipo. Los métodos de administración de un agente profiláctico o terapéutico de la invención incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), administración epidural, administración intratumoral y administración en la mucosa (por ejemplo, rutas intranasales y orales). Además, la administración pulmonar se puede emplear, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador y una formulación con un agente de aerosolización. Véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de EE.UU. n.º 6.019.968; 5.985.320; 5.985.309; 5.934.272; 5.874.064; 5.855.913 y 5.290.540; y de Publicación PCT n.º WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903. En una realización, un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención, una terapia de combinación o una composición de la invención se administra usando tecnología de administración de fármacos por vía pulmonar Alkermes AIR<sup>®</sup> (Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts). En una realización específica, los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención se administran por vía intramuscular, intravenosa, intratumoral, oral, intranasal, pulmonar o subcutánea. Los agentes profilácticos o terapéuticos se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, rectal y mucosa intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

En una realización, la unión específica de anticuerpos acoplados a nanotubos de carbono de (CNT) a las células tumorales *in vitro*, seguida de su ablación altamente específica con luz cercana a infrarroja (NIR), se puede utilizar para dirigirse a células tumorales. Por ejemplo, se pueden utilizar lípidos polares biotinilados para preparar dispersiones estables, biocompatibles, no citotóxicas de CNT que luego se fijan a una o dos DVD-Igs diferentes derivatizadas con neutralita avidina, dirigidas contra uno o varios antígenos tumorales (por ejemplo, CD22) (Chakravarty et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105: 8697-8702 (2008)).

En una realización específica, puede ser deseable administrar los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención de forma local en el área que requiere un tratamiento; esto se puede conseguir, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante infusión local, inyección o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso o no poroso, que incluye membranas y matrices, tales como membranas sialísticas, polímeros, matrices fibrosas (por ejemplo, Tissuel<sup>®</sup>) o matrices de colágeno. En una realización, una cantidad eficaz de uno o varios anticuerpos de la invención antagonistas se administra localmente en la zona afectada a un sujeto para prevenir, tratar, gestionar y/o mejorar un trastorno o un síntoma del mismo. En otra realización, una cantidad eficaz de uno o varios anticuerpos de la invención se administra localmente en la zona afectada de un sujeto en combinación con una cantidad eficaz de una o varias terapias (por ejemplo, uno o varios agentes profilácticos o terapéuticos) distintos de un anticuerpo de la invención para prevenir, tratar, gestionar y/o mejorar un trastorno o uno o varios de sus síntomas.

En otra realización, el agente profiláctico o terapéutico se puede entregar en un sistema de liberación controlada o sostenida. En una realización, se puede emplear una bomba para lograr una liberación controlada o sostenida (véase, Langer, *supra*; Sefton, M.V., CRC Crit. Rev. Biomed. Eng., 14: 201-240 (1987); Buchwald et al., Surgery, 88: 507-516 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med., 321: 574-579 (1989)). En otra realización, se pueden emplear materiales poliméricos para lograr una liberación controlada o sostenida de las terapias de la invención (véase, por



ejemplo, Goodson, J.M., capítulo 6, En Medical Applications of Controlled Release, vol. II, Applications and Evaluation, (Langer y Wise, compiladores) (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1984) pp. 115-138; Langer y Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. Phys., C23(1): 61-126 (1983); véase, también Levy et al., Science, 228:190-192 (1985); During et al., Ann. Neurol., 25:351-356 (1989); Howard et al., J. Neurosurg., 71:105-112 (1989)); documentos de Patente de EE.UU. n° 5.679.377; Patente de EE.UU. n° 5.916.597; Patente de EE.UU. n° 5.912.015; Patente de EE.UU. n° 5.989.463; Patente de EE.UU. n° 5.128.326; Publicación PCT n° WO 99/15154; y publicación PCT n° WO 99/20253. Ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli(metacrilato de 2-hidroxiethyl), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(acetato de etileno-co-vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poliacrilamida, poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicólidos) (PLGA) y poliortoésteres. En una realización ejemplar, el polímero usado en una formulación de liberación sostenida es inerte, exento de impurezas lixiviables, estable durante el almacenamiento, estéril y biodegradable. En aún otra realización, un sistema de liberación controlada o sostenida se puede situar en la proximidad de la diana profiláctica o terapéutica, requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

Los sistemas de liberación controlada se describen en la revisión de Langer (Science, 249: 1527-1533 (1990)). Cualquier técnica conocida por un experto en la técnica se puede utilizar para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o varios agentes terapéuticos de la invención. Véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de EE.UU. n° 4.526.938, de Publicación PCT n° WO 91/05548, Publicación PCT n° WO 96/20698; Ning et al., "Intratumoral radioimmunotherapy of a human colon cancer xenograft using a sustained-release gel", Radiotherapy Oncol., 39: 179-189 (1996); Song et al., "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions", PDA J. Pharm. Sci. Technol., 50: 372-377 (1996); Cleek et al., "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application", Proceed. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 24: 853-854 (1997); y Lam et al., "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery", Proceed. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater., 24: 759-760 (1997).

En una realización específica, cuando la composición de la invención es un ácido nucleico que codifica un agente profiláctico o terapéutico, el ácido nucleico se puede administrar *in vivo* para favorecer la expresión de su agente profiláctico o terapéutico codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de modo que se convierta en intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (véase, el documento de Patente de EE.UU. n° 4.980.286), o mediante inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola de genes; Biolistic®, DuPont) o recubriéndolo con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes de transfección, o administrándolo junto con un péptido similar a una homeobox que se sabe que entra en el núcleo (véase, por ejemplo, Joliot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 1864-1868 (1991)). Alternativamente, un ácido nucleico se puede introducir intracelularmente e incorporar dentro del ADN de la célula hospedadora para una expresión mediante recombinación homóloga.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su vía de administración prevista. Ejemplos de vías de administración incluyen, pero no se limitan a la administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, intranasal (por ejemplo, inhalación), transdérmica (por ejemplo, tópica), transmucosal y rectal. En una realización específica, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para una administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, intranasal o tópica a seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando es necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local, tal como lidocaína, para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

Si las composiciones de la invención se van a administrar por vía tópica, las composiciones se pueden formular en forma de una pomada, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, espray, aerosol, solución, emulsión u otra forma bien conocida por un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19ª ed., Mack Pub. Co., Easton, Pennsylvania (1995). Para las formas de dosificación no pulverizables tópicas, se emplean normalmente formas de viscosas a semisólidas o sólidas que comprenden un vehículo o uno o varios excipientes compatibles con la aplicación tópica y que tienen una viscosidad dinámica preferiblemente mayor que el agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, pomadas, polvos, linimentos, pomadas y similares, que, si se desea, se esterilizan o mezclan con agentes auxiliares (por ejemplo, agentes conservantes, estabilizantes, humectantes, tampones o sales) para influir en diversas propiedades, tales como, por ejemplo, la presión osmótica. Otras formas de dosificación tópica adecuadas incluyen preparaciones en aerosol pulverizables en las que el ingrediente activo, preferiblemente en combinación con un vehículo inerte sólido o líquido, se envasa en una mezcla con un agente volátil presurizado (por ejemplo, un propulsor gaseoso, tal como FREON®) o en una botella presionable. Agentes hidratantes o humectantes también se pueden añadir a las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación, si se desea. Ejemplos de tales ingredientes adicionales son bien conocidos en la técnica.

Si el método comprende una administración intranasal de una composición, la composición puede formularse en una forma de aerosol, espray, pulverización o en forma de gotas. En particular, los agentes profilácticos o terapéuticos para uso de acuerdo con la presente invención se pueden administrar convenientemente en forma de una

presentación de pulverización en aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos (compuestos, por ejemplo, de gelatina) para uso en un inhalador o insuflador, se pueden formular para que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Si el método comprende una administración oral, las composiciones se pueden formular por vía oral en forma de comprimidos, cápsulas, sellos, cápsulas de gel, soluciones, suspensiones y similares. Los comprimidos o cápsulas se pueden preparar por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de almidón de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden estar en forma de, pero no limitadas a, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para constituir con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tamponadas, agentes aromatizantes, colorantes y edulcorantes, según sea apropiado. Las preparaciones para administración oral se pueden formular adecuadamente para una liberación lenta, liberación controlada o liberación sostenida de uno o varios agentes profilácticos o terapéuticos.

El método puede comprender una administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o un nebulizador, de una composición formulada con un agente de aerosolización. Véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de EE.UU. n° 6.019.968; 5.985.320; 5.985.309; 5.934.272; 5.874.064; 5.855.913; y 5.290.540; y de Publicación PCT n° WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903. En una realización específica, un anticuerpo de la invención, una terapia de combinación y/o una composición de la invención se administra utilizando la tecnología de administración de fármacos por vía pulmonar Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts).

El método puede comprender la administración de una composición formulada para administración parenteral mediante inyección (por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua). Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria (por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis) con un conservante añadido. Las composiciones pueden presentar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para reconstituirlo con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril exenta de pirógenos) antes del uso.

Los métodos pueden comprender adicionalmente una administración de composiciones formuladas como preparaciones de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Así, por ejemplo, las composiciones se pueden formular con materiales polímeros o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles (por ejemplo, como una sal poco soluble).

Los métodos de la descripción pueden incluir la administración de composiciones formuladas como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tales como las obtenidas a partir de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc. y las formadas con cationes tales como las obtenidas a partir de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

Generalmente, los ingredientes de las composiciones se suministran por separado o mezclados entre sí en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado exento de agua en un recipiente herméticamente sellado, tal como una ampolla o una bolsita, indicando la cantidad de agente activo. Cuando el modo de administración es una infusión, la composición se puede administrar con una botella de infusión que contiene agua de calidad farmacéutica estéril o solución salina. Cuando el modo de administración es mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina, de manera que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

En particular, la invención también proporciona que uno o varios de los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas de la invención se envasan en un recipiente herméticamente sellado, tal como una ampolla o un sobre indicando la cantidad del agente. En una realización, uno o varios de los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas de la invención, se suministra como un polvo liofilizado esterilizado seco o un concentrado exento de agua en un recipiente herméticamente cerrado y se puede reconstituir (por

ejemplo, con agua o solución salina) hasta la concentración apropiada para la administración a un sujeto. Preferiblemente, uno o varios de los agentes profilácticos o terapéuticos o las composiciones farmacéuticas de la invención, se suministra como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente herméticamente sellado con una dosificación unitaria de al menos 5 mg, más preferiblemente al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 75 mg o al menos 100 mg. Los agentes profilácticos o terapéuticos liofilizados o las composiciones farmacéuticas de la invención deben almacenarse a entre 2°C y 8°C en su envase original y los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas de la invención deben administrarse en 1 semana, preferiblemente en 5 días, en 72 horas, en 48 horas, en 24 horas, en 12 horas, en de 6 horas, en 5 horas, en 3 horas o 1 hora después de haber sido reconstituidos. En una realización alternativa, uno o varios de los agentes profilácticos o terapéuticos o las composiciones farmacéuticas de la invención, se suministra en forma líquida en un recipiente herméticamente cerrado que indica la cantidad y la concentración del agente. Preferiblemente, la forma líquida de la composición administrada se suministra en un recipiente herméticamente sellado de al menos 0,25 mg/ml, más preferiblemente al menos 0,5 mg/ml, al menos 1 mg/ml, al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml o al menos 100 mg/ml. La forma líquida debe almacenarse entre 2°C y 8°C en su envase original.

Los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención se pueden incorporar en una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral. Preferiblemente, el anticuerpo o porciones de anticuerpo se prepararán como una solución inyectable que contiene 0,1-250 mg/ml de anticuerpo. La solución inyectable puede estar compuesta por cualquier forma de dosificación líquida o liofilizada en un frasco incoloro o de color ámbar, una ampolla o una jeringa precargada. El tampón puede ser L-histidina (1-50 mM), óptimamente 5-10 mM, a un pH de 5,0 a 7,0 (óptimamente pH 6,0). Otros tampones adecuados incluyen pero no se limitan a, succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio. El cloruro de sodio puede usarse para modificar la toxicidad de la solución a una concentración de 0-300 mM (óptimamente 150 mM para una forma de dosificación líquida). Pueden incluirse crioprotectores para una forma de dosificación liofilizada, principalmente 0-10% de sacarosa (de manera óptima 0,5-1,0%). Otros crioprotectores adecuados incluyen trehalosa y lactosa. Se pueden incluir agentes de carga para una forma de dosificación liofilizada, principalmente 1-10% de manitol (de manera óptima 2-4%). Se pueden utilizar estabilizadores tanto en las formas de dosificación líquidas como liofilizadas, principalmente L-metionina 1-50 mM (de manera óptima 5-10 mM). Otros agentes de carga adecuados incluyen glicina, arginina, y pueden incluirse como 0-0,05% de polisorbato-80 (de manera óptima 0,005-0,01%). Los tensioactivos adicionales incluyen pero no se limitan a polisorbato 20 y tensioactivos BRIJ. La composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención, preparada como una solución inyectable para administración parenteral, puede comprender además un agente útil como adyuvante, tal como los que se utilizan para aumentar la absorción o dispersión de una proteína terapéutica (por ejemplo, un anticuerpo). Un adyuvante particularmente útil es la hialuronidasa (tal como la hialuronidasa humana recombinante Hylenex®). La adición de hialuronidasa en la solución inyectable mejora la biodisponibilidad humana después de una administración parenteral, particularmente una administración subcutánea. También permite mayores volúmenes en el sitio de la inyección (es decir, mayores que 1 ml) con menos dolor y malestar y una incidencia mínima de reacciones en el sitio de la inyección (véase, documento de Publicación PCT n° WO 2004/078140 y Publicación de EE.UU. n° 2006/104968).

Las composiciones de esta invención pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquida, semisólida y sólida, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo pretendido de administración y de la aplicación terapéutica. Las composiciones preferidas típicas están en forma de soluciones inyectables o infusibles, tales como composiciones similares a las usadas para la inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos. El modo preferido de administración es parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una realización ejemplar, el anticuerpo se administra mediante infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferida, el anticuerpo se administra mediante inyección intramuscular o subcutánea.

Las composiciones terapéuticas normalmente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo (es decir, un anticuerpo o una porción de anticuerpo) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con un ingrediente o una combinación de ingredientes mencionados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los mencionados anteriormente. En el caso de polvos estériles, liofilizados para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y el secado por pulverización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo. La fluidez apropiada de una solución puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Una absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las proteínas de unión de la presente invención se pueden administrar a través de una variedad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la vía/modo de administración preferida es la inyección subcutánea, inyección intravenosa o infusión. Como apreciará el experto en la materia, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. En ciertas realizaciones, el compuesto activo puede prepararse con un vehículo que protegerá el compuesto frente a una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden emplear polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, polioctoésteres y poli(ácido láctico). Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, (J.R. Robinson, compilador) (Marcel Dekker, Inc., New York, 1978).

En ciertas realizaciones, un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención se puede administrar oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) también pueden estar encerrados en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, prensados en comprimidos o incorporados directamente en la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica oral, los compuestos pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Para administrar un compuesto de la invención mediante una vía de administración distinta de la parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto o coadministrar el compuesto con un material para evitar su inactivación.

Los compuestos activos complementarios también se pueden incorporar en las composiciones. En ciertas realizaciones, un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención se formula conjuntamente y/o se coadministra con uno o varios agentes terapéuticos adicionales que son útiles para el tratamiento de trastornos en los que la actividad de IL-1 $\beta$  es perjudicial. Por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-1 $\beta$  humana o una porción de anticuerpo de la invención puede coformularse y/o coadministrarse con uno o varios anticuerpos adicionales que se unen a otras dianas (por ejemplo, anticuerpos que se unen a otras citocinas o que se unen a moléculas de la superficie celular). Además, uno o varios anticuerpos de la invención se pueden usar en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos anteriores. Tales terapias de combinación pueden utilizar ventajosamente dosificaciones menores de los agentes terapéuticos administrados, evitando de este modo posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo para IL-1 $\beta$  o un fragmento del mismo está unido a un vehículo conocido en la técnica que extiende la semivida. Tales vehículos incluyen, pero no se limitan a, el dominio Fc, polietilenglicol y dextrano. Tales vehículos se describen, por ejemplo, en el documento con n° de serie de EE.UU. 09/428.082 (ahora patente de EE.UU. n° 6.660.843).

En una realización específica, las secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un anticuerpo de la invención u otro agente profiláctico o terapéutico de la invención, se administran para tratar, prevenir, gestionar o mejorar un trastorno o uno o varios síntomas del mismo a través de una terapia génica. La terapia génica se refiere a la terapia realizada mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En esta realización de la invención, los ácidos nucleicos producen su anticuerpo codificado o agente profiláctico o terapéutico de la invención que media en un efecto profiláctico o terapéutico.

Se puede emplear cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la técnica de acuerdo con la presente invención. Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véase, Goldspiel et al., *Clinical Pharm.*, 12: 488-505 (1993); Wu et al., "Delivery systems for gene therapy", *Biotherapy*, 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, P., *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32: 573-596 (1993); Mulligan, R.C., *Science*, 260: 926- 932 (1993); y Morgan y Anderson, "Human Gene Therapy", *Ann. Rev. Biochem.*, 62:191-217 (1993); Robinson, C., *Trends Biotechnol.*, 11:155 (1993). Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que se pueden utilizar se describen en Ausubel et al. (compiladores), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York (1993); y Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, New York (1990). Una descripción detallada de los diversos métodos de terapia génica se describen en el documento de Publicación de EE.UU. n° 2005/0042664 A1.

Los miembros de la familia IL-1 (IL-1 $\beta$  y IL-1 $\alpha$ ) desempeñan un papel decisivo en la patología asociada con una variedad de trastornos que implican elementos inmunes e inflamatorios. Una proteína que se une a IL-1 descrita en el presente documento se puede administrar a un individuo para tratar tales trastornos. En una realización, un trastorno que puede ser tratado por un método de la invención que comprende administrar a un sujeto una proteína que se une a IL-1 descrita en este documento, incluye, pero no se limita a, diabetes; uveítis; dolor neuropático; dolor artrósico; dolor inflamatorio; artritis reumatoide; osteoartritis; artritis crónica juvenil; artritis séptica; artritis de Lyme; artritis psoriásica; artritis reactiva; espondiloartropatía; lupus eritematoso sistémico (SLE); enfermedad de Crohn; colitis ulcerosa; enfermedad inflamatoria intestinal; diabetes autoinmune; diabetes mellitus insulino dependiente; tiroiditis; asma; enfermedades alérgicas; psoriasis; dermatitis; esclerodermia; enfermedad de injerto frente a hospedador; rechazo de trasplante de órganos; enfermedad inmune aguda asociada con trasplante de órganos; enfermedad inmune crónica asociada con trasplante de órganos; sarcoidosis; aterosclerosis; coagulación intravascular diseminada (DIC); enfermedad de Kawasaki; enfermedad de Graves; síndrome nefrótico; síndrome de

fatiga crónica; granulomatosis de Wegener; púrpura de Henoch-Schoenlein; vasculitis microscópica de los riñones; hepatitis activa crónica; uveítis autoinmune; choque séptico; síndrome de choque tóxico; síndrome de septicemia; caquexia; enfermedades infecciosas; enfermedades parasitarias; mielitis transversa aguda; corea de Huntington; enfermedad de Parkinson; enfermedad de Alzheimer; ictus; cirrosis biliar primaria; anemia hemolítica; tumores malignos; insuficiencia cardíaca; infarto de miocardio; enfermedad de Addison; deficiencia poliglandular esporádica de tipo I; deficiencia poliglandular de tipo II (síndrome de Schmidt); síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA); alopecia; alopecia areata; artropatía seronegativa; artropatía; enfermedad de Reiter; artropatía psoriásica; artropatía colítica ulcerosa; sinovitis enteropática; clamidia; artropatía asociada a *Yersinia* y *Salmonella*; espondiloartropatía; enfermedad ateromatosa/arteriosclerosis; alergia atópica; enfermedad ampollosa autoinmunitaria; pénfigo vulgar; pénfigo foliáceo; penfigoide; enfermedad de IgA lineal; anemia hemolítica autoinmune; anemia hemolítica positiva de Coombs; anemia perniciosa adquirida; anemia perniciosa juvenil; encefalitis miálgica/enfermedad de Royal Free; candidiasis mucocutánea crónica; arteritis de células gigantes (GCA); hepatitis esclerosante primaria; hepatitis autoinmune criptogénica; síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA); enfermedades relacionadas con la inmunodeficiencia adquirida; hepatitis B; hepatitis C; inmunodeficiencia variada común (hipogammaglobulinemia variable común); miocardiopatía dilatada; infertilidad femenina; insuficiencia ovárica; insuficiencia ovárica prematura; enfermedad pulmonar fibrótica; alveolitis fibrosante criptogénica; enfermedad pulmonar intersticial post-inflamatoria; neumonitis intersticial; enfermedad pulmonar intersticial asociada con enfermedad del tejido conectivo; enfermedad pulmonar asociada con enfermedad mixta del tejido conectivo; enfermedad pulmonar intersticial asociada con esclerosis sistémica; enfermedad pulmonar intersticial asociada con artritis reumatoide; enfermedad pulmonar asociada con lupus eritematoso sistémico; enfermedad pulmonar asociada con dermatomiositis/polmiositis; enfermedad pulmonar asociada con enfermedad de Sjögren; enfermedad pulmonar asociada con espondilitis anquilosante; enfermedad pulmonar difusa vasculítica; enfermedad pulmonar asociada con hemosiderosis; enfermedad pulmonar intersticial inducida por fármacos; fibrosis; fibrosis por radiación; bronquiolitis obliterante; neumonía eosinofílica crónica; enfermedad infiltrativa pulmonar linfocítica; enfermedad pulmonar intersticial postinfecciosa; artritis por gota; hepatitis autoinmune; hepatitis autoinmune de tipo 1 (autoinmune clásica o hepatitis lupoides); hepatitis autoinmune de tipo 2 (hepatitis por anticuerpo anti-LKM); hipoglucemia mediada por autoanticuerpos; resistencia a la insulina de tipo B con acantosis nigricans; hipoparatiroidismo; osteoartritis; colangitis esclerosante primaria; psoriasis de tipo 1; psoriasis de tipo 2; leucopenia idiopática; neutropenia autoinmune; enfermedad renal NOS; glomerulonefritis; vasculitis microscópica de los riñones; enfermedad de Lyme; lupus eritematoso discoide; infertilidad masculina idiopática; infertilidad masculina asociada con óxido nítrico; autoinmunidad del esperma; esclerosis múltiple (todos los subtipos, incluyendo progresiva primaria, progresiva secundaria, remitente recidivante); oftalmia simpática; hipertensión pulmonar secundaria a enfermedad del tejido conectivo; síndrome de Goodpasture; manifestación pulmonar de poliarteritis nodosa; fiebre reumática aguda; espondilitis reumatoide; enfermedad de Still; esclerosis sistémica; síndrome de Sjögren; enfermedad/arteritis de Takayasu; trombocitopenia autoinmune (AITP); trombocitopenia idiopática; enfermedad tiroidea autoinmune; hipertiroidismo; hipotiroidismo autoinmune del bocio (enfermedad de Hashimoto); hipotiroidismo autoinmune atrófico; mixedema primario; uveítis facogénica; vasculitis primaria; vitíligo; enfermedad hepática aguda; enfermedad crónica del hígado; cirrosis alcohólica; lesión hepática inducida por el alcohol; colestasis; enfermedad hepática idiosincrásica; hepatitis inducida por fármacos; esteatohepatitis no alcohólica; alergia; infección con estreptococos del grupo B (GBS); trastornos mentales (por ejemplo, depresión y esquizofrenia); enfermedades mediadas por los tipos Th2 y Th1; dolor agudo y crónico (diferentes formas de dolor); cáncer (tal como cáncer de pulmón, mama, estómago, vejiga, colon, páncreas, ovario, próstata y rectal); tumores malignos hematopoyéticos; leucemia; linfoma; abetalipoproteinemia; acrocianosis; procesos parasitarios o infecciosos agudos y crónicos; leucemia aguda; leucemia linfoblástica aguda (LLA); LLA de linfocitos T; LLA de FAB; leucemia mieloide aguda (AML); infección bacteriana aguda o crónica; pancreatitis aguda; fallo renal agudo; adenocarcinomas; latidos ectópicos auriculares; complejo de demencia y SIDA; hepatitis inducida por el alcohol; conjuntivitis alérgica; dermatitis de contacto alérgica; rinitis alérgica; rechazo de aloinjerto; deficiencia de antitripsina alfa-1; esclerosis lateral amiotrófica; anemia; angina de pecho; degeneración de las células del asta anterior; terapia anti-CD3; síndrome antifosfolípido; reacciones de hipersensibilidad anti-receptor; aneurismas aórticos y periféricos; disección aórtica; hipertensión arterial; arteriosclerosis; fístula arteriovenosa; ataxia; fibrilación auricular (sostenida o paroxística); aleteo auricular; bloqueo auriculoventricular; linfoma de linfocitos B; rechazo de injerto de hueso; rechazo de trasplante de médula ósea (BMT); bloqueo de rama; linfoma de Burkitt; quemaduras; arritmias cardíacas; síndrome de aturdimiento cardíaco; tumores cardíacos; cardiomiopatía; respuesta inflamatoria a derivación cardiopulmonar; rechazo de trasplante de cartílago; degeneraciones corticales cerebelares; trastornos cerebelosos; taquicardia auricular caótica o multifocal; trastornos asociados a la quimioterapia; leucemia mielocítica crónica (CML); alcoholismo crónico; patologías inflamatorias crónicas; leucemia linfocítica crónica (CLL); enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); intoxicación con salicilato crónica; carcinoma colorrectal; insuficiencia cardíaca congestiva; conjuntivitis; dermatitis de contacto; cor pulmonale; enfermedad de la arteria coronaria; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; septicemia negativa de cultivo; fibrosis quística; trastornos asociados con terapia de citocinas; demencia pugilística; enfermedades desmielinizantes; fiebre hemorrágica del dengue; dermatitis; alteraciones dermatológicas; diabetes mellitus; enfermedad arteriosclerótica diabética; enfermedad difusa de cuerpos de Lewy; miocardiopatía dilatada congestiva; trastornos de los ganglios basales; síndrome de Down en la mediana edad; trastornos del movimiento inducidos por fármacos que bloquean los receptores de dopamina del SNC; sensibilidad a los fármacos; eczema; encefalomielititis; endocarditis; endocrinopatía; epiglotitis; infección con el virus Epstein-Barr; eritromialgia; trastornos extrapiramidales y cerebelosos; linfocitosis hemofagocítica familiar; rechazo de implante de timo fetal; ataxia de Friedreich; trastornos arteriales periféricos funcionales; septicemia fúngica; gangrena gaseosa; úlcera gástrica;

nefritis glomerular; rechazo del injerto de cualquier órgano o tejido; septicemia gram negativa; septicemia gram positiva; granulomas debidos a organismos intracelulares; leucemia de células pilosas; enfermedad de Hallervorden-Spatz; tiroiditis de Hashimoto; fiebre del heno; rechazo de trasplante de corazón; hemocromatosis; hemodiálisis; síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombótica; hemorragia; hepatitis A; arritmias de rama His;

5 infección por VIH/neuropatía por VIH; enfermedad de Hodgkin; trastornos del movimiento hipercinéticos; reacciones de hipersensibilidad; neumonitis por hipersensibilidad; hipertensión; trastornos de movimiento hipocinéticos; evaluación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal; enfermedad de Addison idiopática; fibrosis pulmonar idiopática (IPF); citotoxicidad mediada por anticuerpos; astenia; atrofia muscular espinal infantil; inflamación de la aorta; gripe

10 A; exposición a radiación ionizante; iridociclitis/uveítis/neuritis óptica; lesión por isquemia-reperusión; ictus isquémico; artritis reumatoide juvenil; atrofia muscular espinal juvenil; sarcoma de Kaposi; rechazo de trasplante de riñón; legionella; leishmaniasis; lepra; lesiones del sistema corticoespinal; lipedema; rechazo de trasplante de hígado; linfedema; malaria; linfoma maligno; histiocitosis maligna; melanoma maligno; meningitis; meningococcemia; dolor de cabeza migraña por síndrome metabólico; dolor de cabeza migraña idiopática; trastorno multisistémico

15 mitocondrial; enfermedad mixta del tejido conectivo; gammapatía monoclonal; mieloma múltiple; degeneraciones múltiples sistemas (Menzel; Dejerine-Thomas; Shy-Drager y Machado-Joseph); miastenia grave; mycobacterium avium intracellulare; tuberculosis micobacteriana; síndrome mielodisplásico; infarto de miocardio; trastornos isquémicos de miocardio; carcinoma nasofaríngeo; enfermedad pulmonar crónica neonatal; nefritis; nefrosis; enfermedades neurodegenerativas; atrofas musculares neurogénicas I; neutropenia febril; linfoma no Hodgkin; oclusión de la aorta abdominal y sus ramas; trastornos arteriales oclusivos; terapia OKT3®; orquitis/epididimitis;

20 procedimientos de reversión de orquitis/vasectomía; organomegalia; osteoporosis; rechazo de trasplante de páncreas; carcinoma de páncreas; síndrome paraneoplásico/hipercalcemia de malignidad; rechazo de trasplante de paratiroides; enfermedad inflamatoria pélvica; rinitis perenne; enfermedad pericárdica; enfermedad aterosclerótica periférica; trastornos vasculares periféricos; peritonitis; anemia perniciosa; neumonía por Pneumocystis carinii; neumonía; síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammapatía monoclonal y

25 síndrome de cambios en la piel); síndrome posterior a perfusión; síndrome posterior a bomba; síndrome de cardiectomía post-MI; preeclampsia; parálisis de supra núcleo progresiva; hipertensión pulmonar primaria; terapia de radiación; fenómeno de Raynaud; enfermedad de Raynaud; enfermedad de Refsum; taquicardia regular estrecha QRS; hipertensión renovascular; lesión por reperusión; cardiomiopatía restrictiva; sarcomas; corea senil; demencia senil de tipo cuerpos de Lewy; artropatías seronegativas; choque; anemia falciforme; rechazo de aloinjertos de piel;

30 síndrome de cambios de piel; rechazo de trasplante de intestino delgado; tumores sólidos; arritmias específicas; ataxia espinal; degeneraciones espinocerebelares; miositis estreptocócica; lesiones estructurales del cerebelo; panencefalitis esclerosante subaguda; síncope; sífilis del sistema cardiovascular; anafilaxia sistémica; síndrome de respuesta inflamatoria sistémica; artritis reumatoide juvenil de inicio sistémico; telangiectasia; tromboangitis obliterante; trombocitopenia; toxicidad; trasplantes; trauma/hemorragia; reacciones de hipersensibilidad de tipo III;

35 hipersensibilidad de tipo IV; angina inestable; uremia; septicemia urinaria; urticaria; enfermedades cardíacas valvulares; venas varicosas; vasculitis; enfermedades venosas; trombosis venosa; fibrilación ventricular; infecciones víricas y fúngicas; encefalitis vírica/meningitis aséptica; síndrome hemofagocítico asociado vírico; síndrome de Wernicke-Korsakoff; enfermedad de Wilson; rechazo de xenoinjerto de cualquier órgano o tejido; síndromes coronarios agudos; polineuritis aguda idiopática; polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria aguda;

40 isquemia aguda; enfermedad de Still del adulto; alopecia areata; anafilaxia; síndrome de anticuerpos anti-fosfolípido; anemia aplásica; arteriosclerosis; eczema atópico; dermatitis atópica; dermatitis autoinmune; trastorno autoinmune asociado con infección de *Streptococcus*; enteropatía autoinmune; pérdida de la audición autoinmune; síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS); miocarditis autoinmune; insuficiencia ovárica prematura autoinmune; blefaritis; bronquiectasias; penfigoide ampollar; enfermedad cardiovascular; síndrome antifosfolípido catastrófico;

45 enfermedad celíaca; espondilosis cervical; isquemia crónica; penfigoide cicatricial; síndrome clínicamente aislado (CIS) con riesgo de esclerosis múltiple; conjuntivitis; trastorno psiquiátrico de inicio en la infancia; dacriocistitis; dermatomiositis; retinopatía diabética; hernia de disco; prolapso de disco; anemia hemolítica inmune inducida por fármacos; endocarditis; endometriosis; endoftalmitis; epiescleritis; eritema multiforme; eritema multiforme mayor; penfigoide gestacional; síndrome de Guillain-Barré (GBS); fiebre del heno; síndrome de Hughes; enfermedad de

50 Parkinson idiopática; neumonía intersticial idiopática; alergia mediada por IgE; anemia hemolítica inmune; miositis por cuerpos de inclusión; enfermedad inflamatoria ocular infecciosa; enfermedad desmielinizante inflamatoria; enfermedad cardíaca inflamatoria; enfermedad renal inflamatoria; iritis; queratitis; queratoconjuntivitis seca; enfermedad de Kussmaul o enfermedad de Kussmaul-Meier; parálisis de Landry; histiocitosis de células de Langerhans; livedo reticularis; degeneración macular; poliangeitis microscópica; Morbus Bechterev; trastornos de las

55 neuronas motoras; penfigoide de la membrana mucosa; fallo multiorgánico; miastenia grave; síndrome mielodisplásico; miocarditis; trastornos de la raíz nerviosa; neuropatía; hepatitis no A no B; neuritis óptica; osteolisis; JRA pauciarticular; enfermedad oclusiva arterial periférica (EAOP); enfermedad vascular periférica (PVD); enfermedad arterial periférica (PAD); flebitis; poliarteritis nodosa (o periarteritis nodosa); policondritis; polimialgia reumática; poliosis; JRA poliarticular; síndrome de deficiencia poliendocrino; polimiositis; polimialgia reumática

60 (PMR); síndrome de post-bomba; parkinsonismo primario; parkinsonismo secundario; prostatitis; aplasia pura de glóbulos rojos; insuficiencia suprarrenal primaria; neuromielitis óptica recurrente; reestenosis; cardiopatía reumática; SAPHO (sinovitis, acné, pustulosis, hiperostosis y osteitis); amiloidosis secundaria; choque pulmonar; escleritis; ciática; insuficiencia suprarrenal secundaria; enfermedad del tejido conectivo asociada a silicona; dermatosis de Sneddon-Wilkinson; espondilitis anquilosante; síndrome de Stevens-Johnson (SJS); síndrome de respuesta

65 inflamatoria sistémica; arteritis temporal; retinitis toxoplásmica; necrosis epidérmica tóxica; mielitis transversa; TRAPS (síndrome periódico asociado al receptor del factor de necrosis tumoral de tipo 1 (TNFR)); resistencia a la

insulina de tipo B con acantosis nigricans; reacción alérgica de tipo 1; diabetes de tipo II; urticaria; neumonía intersticial usual (UIP); conjuntivitis vernal; retinitis vírica; síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (síndrome VKH); degeneración macular húmeda; cicatrización de heridas; artropatía asociada a *Yersinia* y *Salmonella*.

5 Las proteínas de unión de la invención se pueden utilizar para tratar seres humanos que padecen enfermedades autoinmunes, en particular las asociadas con inflamación, artritis reumatoide (AR), osteoartritis, psoriasis, esclerosis múltiple (ES) y otras enfermedades autoinmunes.

Un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención también se puede administrar con uno o varios agentes terapéuticos adicionales, útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

10 En una realización, las enfermedades que se pueden tratar o diagnosticar con las composiciones y los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, cánceres primarios y metastásicos, incluyendo carcinomas de mama, colon, recto, pulmón, orofaringe, hipofaringe, esófago, estómago, páncreas, hígado, vesícula biliar y conductos biliares, intestino delgado, tracto urinario (incluyendo riñón, vejiga y urotelio), tracto genital femenino (incluyendo cuello uterino, útero y ovarios, así como coriocarcinoma y enfermedad trofoblástica gestacional), tracto genital masculino (incluyendo próstata, vesículas seminales, testículos y tumores de células germinales), glándulas endocrinas (incluyendo tiroideas, suprarrenales y glándulas pituitaria) y piel, así como hemangiomas, melanomas, sarcomas (incluyendo los generados en tejidos óseos y blandos así como el sarcoma de Kaposi), tumores de cerebro, nervios, ojos y meninges (incluyendo astrocitomas, gliomas, glioblastomas, retinoblastomas, neuromas, neuroblastomas, schwannomas y meningiomas), tumores sólidos que surgen de tumores malignos hematopoyéticos tales como leucemias y linfomas (tanto linfomas de Hodgkin como de no Hodgkin).

20 En otra realización, un anticuerpo de la invención o una porción del mismo que se une a antígeno se usa para tratar el cáncer o en la prevención de metástasis desde un tumor. Tal tratamiento puede implicar la administración del anticuerpo o una porción del mismo que se une a antígeno, solo o en combinación con otro agente o tratamiento terapéutico, tal como radioterapia y/o un agente quimioterapéutico.

25 Los anticuerpos de la invención, o porciones de los mismos que se unen a antígeno, se pueden combinar con agentes que incluyen pero no se limitan a, agentes antineoplásicos, radioterapia, quimioterapia, tales como agentes alquilantes de ADN, cisplatino, carboplatino, agentes anti-tubulina, paclitaxel, docetaxel, taxol, doxorubicina, gemcitabina, gemzar, antraciclinas, adriamicina, inhibidores de la topoisomerasa I, inhibidores de la topoisomerasa II, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, irinotecán, inhibidores de la tirosina cinasa de receptor (por ejemplo, erlotinib, gefitinib), inhibidores de COX-2 (por ejemplo, celecoxib), inhibidores de cinasa y siARNs.

30 Una proteína de unión de la invención también se puede administrar con uno o varios agentes terapéuticos adicionales útiles en el tratamiento de diversas enfermedades.

35 Los anticuerpos de la invención, o porciones de los mismos que se unen a antígeno, se pueden usar solos o en combinación para tratar tales enfermedades. Debe entenderse que los anticuerpos de la invención o una porción de los mismos que se une a antígeno, se pueden usar solos o en combinación con un agente adicional, por ejemplo, un agente terapéutico, en donde dicho agente adicional es seleccionado por el experto en la materia para su fin pretendido. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en la técnica por ser útil para tratar la enfermedad o afección que está siendo tratada con el anticuerpo de la presente invención. El agente adicional también puede ser un agente que imparte un atributo beneficioso a la composición terapéutica, por ejemplo, un agente que afecta a la viscosidad de la composición.

40 Debe entenderse además que las combinaciones que se van a incluir dentro de esta invención son aquellas combinaciones útiles para su fin previsto. Los agentes que se exponen a continuación son ilustrativos para los fines y no pretenden limitar. Las combinaciones, que forman parte de esta invención, pueden ser los anticuerpos de la presente invención y al menos un agente adicional seleccionado a partir de las listas más abajo. La combinación también puede incluir más de un agente adicional, por ejemplo, dos o tres agentes adicionales si la combinación es tal que la composición formada puede realizar su función prevista.

45 Las combinaciones preferidas son uno o varios fármacos no esteroideos, antiinflamatorios también denominados AINEs que incluyen fármacos como el ibuprofeno. Otras combinaciones preferidas son corticosteroides que incluyen prednisolona; los efectos secundarios bien conocidos del uso de esteroideos se pueden reducir o incluso eliminar al reducir la dosis de esteroideos requerida cuando se tratan pacientes en combinación con los anticuerpos anti-IL-1 $\beta$  de esta invención. Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la artritis reumatoide con los que se puede combinar un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: fármacos antiinflamatorios supresores de citocinas (CSAIDs); anticuerpos o antagonistas de otras citocinas humanas o factores de crecimiento, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21, interferones, EMAP-II, GM-CSF, FGF y PDGF. Los anticuerpos de la invención, o porciones de los mismos que se unen a antígeno, se pueden combinar con anticuerpos para moléculas de la superficie celular, tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, CTLA o sus ligandos incluyendo CD154 (gp39 o CD40L).

Las combinaciones preferidas de agentes terapéuticos pueden interferir en diferentes puntos de la cascada

autoinmune y posteriormente inflamatoria; los ejemplos preferidos incluyen antagonistas de TNF como anticuerpos de TNF quiméricos, humanizados o humanos, D2E7, (documento de Publicación PCT n° WO 97/29131), CA2 (Remicade®), CDP 571 y receptores de TNF p55 o p75 solubles, derivados, de los mismos, (p75TNFR1gG (Enbrel®) o p55TNFR1gG (lenercept) y también inhibidores de la enzima convertidora de TNF $\alpha$  (TACE); de forma similar, los inhibidores de IL-1 (inhibidores de la enzima convertidora de interleucina-1, IL-1RA etc.) pueden ser eficaces por la misma razón. Otros combinaciones preferidas incluyen interleucina 11. Todavía otra combinación preferida son otros actores clave de la respuesta autoinmune que pueden actuar en paralelo, dependiendo o en sintonía con la función de IL-1 $\beta$ . Todavía otra combinación preferida incluye inhibidores anti-CD4 sin agotar. Todavía otras combinaciones preferidas incluyen antagonistas de la ruta coestimuladora de CD80 (B7.1) o CD86 (B7.2) que incluyen anticuerpos, receptores solubles o ligandos antagonistas.

Los anticuerpos de la invención, o porciones de los mismos que se unen a antígeno, también pueden combinarse con agentes, tales como metotrexato, 6-MP, sulfasalazina azatioprina, mesalazina, olsalazina cloroquina/hidroxiclороquina, pencilamina, aurotiomato (intramuscular y oral), azatioprina, colchicina, corticosteroides (orales, inhalados e inyección local), agonistas del receptor beta-2 adrenérgico (salbutamol, terbutalina, salmeteral), xantinas (teofilina, aminofilina), cromoglicato, nedocromil, ketotifeno, ipratropio y oxitropio, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato de mofetilo, leflunomida, AINEs, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tales como prednisolona, inhibidores de la fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización mediante citocinas proinflamatorias, tales como TNF- $\alpha$  o IL-1 (por ejemplo, inhibidores de las cinasas IRAK, NIK, IKK, p38 o MAP), inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 $\beta$ , inhibidores de la enzima convertidora de TNF $\alpha$  (TACE), inhibidores de la señalización de linfocitos T tales como inhibidores de cinasa, inhibidores de metaloproteína, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores de citocina solubles y derivados de los mismos (por ejemplo, receptores solubles de TNF p55 o p75 y los derivados p75TNFR1gG (Enbrel®) y p55TNFR1gG (Lenercept)), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), citocinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGF $\beta$ ), celecoxib, ácido fólico, sulfato de hidroxiclороquina, rofecoxib, etanercept, infliximab, naproxeno, valdecoxib, sulfasalazina, metilprednisolona, meloxicam, acetato de metilprednisolona, tiomalato sódico de oro, aspirina, triamcinolona acetónido, napsilato de propoxifeno/apap, folato, nabumetona, diclofenaco, piroxicam, etodolaco, diclofenaco de sodio, oxaprozina, HCl de oxicodona, bitartrato de hidrocodona/apap, diclofenaco de sodio/misoprostol, fentanilo, anakinra, recombinante humano, HCl de tramadol, salsalato, sulindaco, cianocobalamina/fa/piridoxina, acetaminofeno, alendronato de sodio, prednisolona, sulfato de morfina, clorhidrato de lidocaína, indometacina, glucosamina sulf/condroitina, HCl de amitriptilina, sulfadiazina, HCl de oxicodona/acetaminofeno, HCl de olopatadina, misoprostol, naproxeno sódico, omeprazol, ciclofosfamida, rituximab, IL-1 TRAP, MRA, CTLA4 -IG, IL-18 BP, anti-IL-18, anti-IL15, BIRB-796, SCIO-469, VX-702, AMG-548, VX-740, Roflumilast, IC-485, CDC-801 y Mesopram. Las combinaciones preferidas incluyen metotrexato o leflunomida y en casos de artritis reumatoide moderada o grave, ciclosporina.

Agentes adicionales no limitantes que también se pueden utilizar en combinación con una proteína de unión para tratar la artritis reumatoide (AR) incluyen, pero no se limitan a los siguientes: fármacos no esteroides antiinflamatorios (AINEs); fármacos antiinflamatorios supresores de citocinas (CSAIDs); CDP-571/BAY-10-3356 (anticuerpo humanizado anti-TNF $\alpha$ ; Celltech/Bayer); cA2/infliximab (anticuerpo anti-TNF $\alpha$  quimérico; Centocor); 75 kDTNFR-IgG/etanercept (proteína de fusión receptor de TNF 75 kD-IgG; Immunex; véase, *por ejemplo*, Moreland et al., (Resumen n° 813), *Arthritis Rheum.*, 37: S295 (1994); Baumgartner et al., *J. Invest. Med.*, 44(3): 235A (marzo de 1996); 55 kDTNFR-IgG (proteína de fusión receptor de TNF 55 kD-IgG; Hoffmann-LaRoche); IDEC-CE9.1/SB 210396 (anticuerpo anti-CD4 no agotado primatizado; IDEC/SmithKline; véase, *por ejemplo*, Kaine et al. (Resumen n° 195), *Arthritis Rheum.*, 38: S185 (1995)); DAB 486-IL-2 y/o DAB 389-IL-2 (proteínas de fusión de IL-2; Seragen; véase, *por ejemplo*, Sewell et al., *Arthritis Rheum.*, 36(9): 1223-1233 (septiembre de 1993)); Anti-Tac (anti-IL-2R $\alpha$  humanizado; Protein Design Labs/Roche); IL-4 (citocina antiinflamatoria; DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; IL-10 recombinante, citocina antiinflamatoria; DNAX/Schering); IL-4; agonistas de IL-10 y/o IL-4 (por ejemplo, anticuerpos agonistas); IL-1RA (antagonista del receptor de IL-1; Synergen/Amgen); anakinra (Kineret®/Amgen); TNF-bp/s-TNF (proteína de unión a TNF soluble; véase, *por ejemplo*, Evans et al. (Resumen n° 1540), *Arthritis Rheum.*, 39(9) (suplemento): S284 (1996)); Kapadia et al., *Amer. J. Physiol. - Heart and Circulatory Physiology*, 268: H517-H525 (1995)); RP73401 (inhibidor de la fosfodiesterasa de tipo IV; véase, *por ejemplo*, Chikanza et al. (Resumen n° 1527), *Arthritis Rheum.*, 39(9) (suplemento): S282 (1996)); MK-966 (inhibidor de COX-2; véase, *por ejemplo*, Erich et al. (Resumen n° 328 y 329), *Arthritis Rheum.*, 39(9) (suplemento): S81 (1996)); Iloprost (véase, *por ejemplo*, Scholz, P. (Resumen n° 336), *Arthritis Rheum.*, 39(9) (suplemento): S82 (1996)); metotrexato; talidomida (véase, *por ejemplo*, Lee et al. (Resumen n° 1524), *Arthritis Rheum.*, 39(9) (suplemento): S282 (1996)) y fármacos relacionados con talidomida (*por ejemplo*, Celgen); leflunomida (antiinflamatorio e inhibidor de citocinas; véase, *por ejemplo*, Finnegan et al. (Resumen n° 627), *Arthritis Rheum.*, 39(9) (suplemento): S131 (1996)); Thoss et al., *Inflamm. Res.*, 45: 103-107 (1996)); ácido tranexámico (inhibidor de la activación de plasminógeno; véase, *por ejemplo*, Ronday et al. (Resumen n° 1541), *Arthritis Rheum.*, 39(9) (suplemento): S284 (1996)); T-614 (inhibidor de citocina, véase, *por ejemplo*, Hara et al. (Resumen n° 1526), *Arthritis Rheum.*, 39(9) (suplemento): S282 (1996)); prostaglandina E1 (véase, *por ejemplo*, Moriuchi et al. (Resumen n° 1528), *Arthritis Rheum.*, 39(9) (suplemento): S282 (1996)); Tenidap (fármaco no esteroideo antiinflamatorio; véase, *por ejemplo*, Guttadauria, M. (Resumen n° 1516), *Arthritis Rheum.*, 39(9) (suplemento): S280 (1996)); Naproxeno (fármaco no esteroideo antiinflamatorio; véase, *por ejemplo*, Fiebich et al., *Neuro Report*, 7: 1209-1213 (1996)); Meloxicam (fármaco no esteroideo antiinflamatorio); ibuprofeno (fármaco no



5 esteroideo antiinflamatorio); Piroxicam (fármaco no esteroideo antiinflamatorio); Diclofenac (fármaco no esteroideo antiinflamatorio); indometacina (fármaco no esteroideo antiinflamatorio); sulfasalazina (véase, por ejemplo, Farr et al. (Resumen nº 1519), *Arthritis Rheum.*, 39(9) (suplemento): S281 (1996)); Azatioprina (véase, por ejemplo, Hickey et al. (Resumen nº 1521), *Arthritis Rheum.*, 39(9) (suplemento): S281 (1996)); inhibidor de ICE (inhibidor de la enzima convertidora de interleucina-1 $\beta$ ); inhibidor de zap-70 y/o 1ck (inhibidor de la tirosina cinasa zap-70 o lck); inhibidor de VEGF y/o inhibidor de VEGFR (inhibidores del factor de crecimiento celular endotelial vascular o del receptor del factor de crecimiento celular endotelial vascular; inhibidores de la angiogénesis); fármacos corticosteroides antiinflamatorios (por ejemplo, SB203580); inhibidores de la convertasa de TNF; anticuerpos anti-IL-12; anticuerpos anti-IL-18; interleucina-11 (véase, por ejemplo, Keith Jr. et al. (Resumen nº 1613), *Arthritis Rheum.*, 39(9) (suplemento): S296 (1996)); interleucina-13 (véase, por ejemplo, Bessis et al. (Resumen nº 1681), *Arthritis Rheum.*, 39(9) (suplemento): S308 (1996)); inhibidores de interleucina-17 (véase, por ejemplo, Lotz et al. (Resumen nº 559), *Arthritis Rheum.*, 39(9) (suplemento): S120 (1996)); oro; penicilamina; cloroquina; clorambucilo; hidroxicloroquina; ciclosporina; ciclofosfamida; radiación linfoides total, globulina anti-timocitos; anticuerpos anti-CD4; toxinas CD5; péptidos y colágeno administrados por vía oral; lobenzarit disódico; agentes reguladores de citocinas (CRAs) HP228 y HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); ICAM-1 oligo-desoxinucleótidos fosforotioato antisentido (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); receptor del complemento soluble 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); prednisona; orgoteína; polisulfato de glicosaminoglicano; minociclina; anticuerpos anti-IL2R; lípidos marinos y botánicos (ácidos grasos de peces y semillas de plantas; véase, por ejemplo, DeLuca et al., *Rheum. Dis. Clin. North. Am.*, 21: 759-777 (1995)); auranoquina; fenilbutazona; ácido meclofenámico; ácido flufenámico; inmunoglobulina intravenosa; zileuton; azaribina; ácido micofenólico (RS-61443); tacrolímus (FK-506); sirolímus (rapamicina); amiprilosa (terafectina); cladribina (2-clorodeoxiadenosina); metotrexato; inhibidores de bcl-2 (véase, Bruncko et al., *J. Med. Chem.*, 50(4), 641-662 (2007)); agentes antivirales y moduladores inmunes.

25 En una realización, la proteína de unión o una porción de la misma que se une a antígeno, se administra en combinación con uno de los siguientes agentes para el tratamiento de la artritis reumatoide (AR): inhibidor de molécula pequeña de KDR, inhibidor de molécula pequeña de Tie-2; metotrexato; prednisona; celecoxib; ácido fólico; sulfato de hidroxicloroquina; rofecoxib; etanercept; infliximab; leflunomida; naproxeno; valdecoxib; sulfasalazina; metilprednisolona; ibuprofeno; meloxicam; acetato de metilprednisolona; tiomalato sódico de oro; aspirina; azatioprina; triamcinolona acetónido; napsilato de propoxifeno/apap; folato; nabumetona; diclofenaco; piroxicam; etodolaco; diclofenaco sódico; oxaprozina; HCl de oxicodona; bitartrato de hidrocodona/apap; diclofenaco sódico/misoprostol; fentanilo; anakinra, recombinante humano; HCl de tramadol; salsalato; sulindaco; cianocobalamina/fa/piridoxina; acetaminofeno; alendronato sódico; prednisolona; sulfato de morfina; clorhidrato de lidocaína; indometacina; sulfato de glucosamina/condroitina; ciclosporina; HCl de amitriptilina; sulfadiazina; HCl de oxicodona/acetaminofeno; HCl de olopatadina; misoprostol; naproxeno sódico; omeprazol; micofenolato de mofetilo; ciclofosfamida; rituximab; IL-1 TRAP; MRA; CTLA4-IG; IL-18 BP; IL-12/23; anti-IL 18; anti-IL 15; BIRB-796; SCIO-469; VX-702; AMG-548; VX-740; Roflumilast; IC-485; CDC-801; y mesopram.

40 Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la enfermedad inflamatoria intestinal con los que una proteína de unión de la invención puede combinarse, incluyen los siguientes: budenosida; factor de crecimiento epidérmico; corticosteroides; ciclosporina; sulfasalazina; aminosalicilatos; 6-mercaptopurina; azatioprina; metronidazol; inhibidores de lipoxigenasa; mesalamina; olsalazina; balsalazida; antioxidantes; inhibidores de tromboxano; antagonistas del receptor de IL-1; AcMos anti-IL-1; AcMos anti-IL-6; factores de crecimiento; inhibidores de elastasa; compuestos de piridinil-imidazol; anticuerpos o antagonistas de otras citocinas humanas o factores de crecimiento, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF y PDGF. Los anticuerpos de la invención, o porciones de los mismos que se unen a antígeno, se pueden combinar con anticuerpos para moléculas de la superficie celular, tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos. Los anticuerpos de la invención, o porciones de los mismos que se unen a antígeno, también pueden combinarse con agentes, tales como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato de mofetilo, leflunomida, AINEs, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización mediante citocinas proinflamatorias, tales como TNF $\alpha$  o IL-1 (por ejemplo, inhibidores de cinasa IRAK, NIK, IKK, p38 o MAP), inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 $\beta$ , inhibidores de la enzima convertidora de TNF $\alpha$ , inhibidores de la señalización de linfocitos T tales como inhibidores de cinasa, inhibidores de metaloproteínasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores de citocinas solubles y derivados de los mismos (por ejemplo, receptores solubles de TNF p55 o p75, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) y citocinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGF $\beta$ ) e inhibidores de bcl-2.

60 Ejemplos de agentes terapéuticos para la enfermedad de Crohn con los que se puede combinar una proteína de unión, incluyen los siguientes: antagonistas de TNF, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF, Adalimumab (documento de Publicación PCT nº WO 97/29131; HUMIRA<sup>®</sup>), CA2 (REMICADE), CDP 571, estructuras artificiales de TNFR-Ig, inhibidores de (p75TNFR)IgG (ENBREL<sup>®</sup>) y p55TNFR)IgG (LENERCEPT<sup>®</sup>) e inhibidores de PDE4. Los anticuerpos de la invención, o porciones de los mismos que se unen a antígeno, se pueden combinar con corticosteroides, por ejemplo, budenosida y dexametasona. Las proteínas de unión de la invención o porciones de las mismas que se unen a antígeno, también pueden combinarse con agentes tales como sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico y olsalazina y agentes que interfieren con la síntesis o la acción de citocinas proinflamatorias tales como IL-1, por

ejemplo, inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 e IL-1ra. Los anticuerpos de la invención o porciones de los mismos que se unen a antígeno se pueden usar también con inhibidores de la señalización de linfocitos T, por ejemplo, inhibidores de tirosina cinasa 6-mercaptapurinas. Las proteínas de unión de la invención, o porciones de las mismas que se unen a antígeno, se pueden combinar con IL-11. Las proteínas de unión de la invención, o porciones de las mismas que se unen a antígeno, se pueden combinar con mesalamina, prednisona, azatioprina, mercaptopurina, infliximab, succinato sódico de metilprednisolona, difenoxilato/atrop sulfato, clorhidrato de loperamida, metotrexato, omeprazol, folato, ciprofloxacina/dextrosa-agua, bitartrato de hidrocodona/apap, clorhidrato de tetraciclina, fluocinonida, metronidazol, timerosal/ácido bórico, colestiramina/sacarosa, clorhidrato de ciprofloxacina, sulfato de hiosciamina, clorhidrato de meperidina, clorhidrato de midazolam, HCl de oxycodona/acetaminofeno, clorhidrato de prometazina, fosfato de sodio, sulfametoxazol/trimetoprim, celecoxib, policarbofilo, napsilato de propoxifeno, hidrocortisona, multivitaminas, balsalazida disódica, fosfato de codeína/apap, HCl de colesevelam, cianocobalamina, ácido fólico, levofloxacina, metilprednisolona, natalizumab e interferón-gamma.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la esclerosis múltiple (ES) con los que las proteínas de unión de la invención pueden combinarse, incluyen los siguientes: corticosteroides; prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida; ciclosporina; metotrexato; 4-aminopiridina; tizanidina; interferón-β1a (AVONEX; Biogen); interferón-β1b (BETASERON; Chiron/Berlex); interferón α-n3 (Interferon Sciences/Fujimoto), interferón-α (Alfa Wassermann/J&J), interferón β1A-IF (Serono/Inhale Therapeutics), Peginterferón α 2b (Enzon/Schering-Plough), Copolímero 1 (Cop-1; COPAXONE; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); oxígeno hiperbárico; inmunoglobulina intravenosa; clabribina; anticuerpos o antagonistas de otras citocinas humanas o factores de crecimiento y sus receptores, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-23, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF y PDGF. Las proteínas de unión de la invención se pueden combinar con anticuerpos de moléculas de la superficie celular, tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 o sus ligandos. Las proteínas de unión de la invención, también pueden combinarse con agentes, tales como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato de mofetilo, leflunomida, AINEs, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización mediante citocinas proinflamatorias, tales como TNFα o IL-1 (por ejemplo, inhibidores de cinasa IRAK, NIK, IKK, p38 o MAP), inhibidores de la enzima convertidora de IL-1β, inhibidores de TACE, inhibidores de la señalización de linfocitos T tales como inhibidores de cinasa, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptapurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores de citocina solubles y derivados de los mismos (por ejemplo, receptores de TNF solubles p55 o p75, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), citocinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-13 y TGFβ) e inhibidores de bcl-2.

Ejemplos de agentes terapéuticos para la esclerosis múltiple con los que se pueden combinar las proteínas de unión de la invención, incluyen interferón-β, por ejemplo, IFNβ1a y IFNβ1b; copaxona; corticosteroides; inhibidores de caspasa, por ejemplo, inhibidores de la caspasa-1; inhibidores de IL-1; inhibidores de TNF; y anticuerpos para un ligando de CD40 y CD80.

Las proteínas de unión de la invención, también pueden combinarse con agentes, tales como alemtuzumab, dronabinol, Unimed, daclizumab, mitoxantrona, clorhidrato de xaliprodeno, fampridina, acetato de glatiramer, natalizumab, sinnabidol, NNSO3 a-inmucocina, ABR-215062, Anergix.MS, antagonistas del receptor de quimiocinas, BBR-2778, calagualina, CPI-1189, LEM (mitoxantrona encapsulada en liposomas), THC.CBD (agonista de cannabinoide) MBP-8298, mesopram (inhibidor de PDE4), MNA-715, anticuerpo anti-receptor de IL-6, neurovax, pirfenidona allotrap 1258 (RDP-1258), sTNF-R1, talampanel, teriflunomida, TGF-beta2, tiplimotida, antagonistas de VLA4 (por ejemplo, TR-14035, VLA4 Ultrahaler, Antegran-ELAN/Biogen), antagonistas del interferón gamma, agonistas de IL-4.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la angina de pecho con los que se pueden combinar las proteínas de unión de la invención, incluyen los siguientes: aspirina, nitroglicerina, mononitrato de isosorbida, succinato de metoprolol, atenolol, tartrato de metoprolol, besilato de amlodipina, clorhidrato de diltiazem, dinitrato de isosorbida, bisulfato de clopidogrel, nifedipina, atorvastatina de calcio, cloruro de potasio, furosemida, simvastatina, HCl de verapamilo, digoxina, clorhidrato de propranolol, carvedilol, lisinopril, espironolactona, hidroclorotiazida, maleato de enalapril, nadolol, ramipril, enoxaparina sódica, heparina sódica, valsartán, clorhidrato de sotalol, fenofibrato, ezetimiba, bumetanida, losartán potásico, lisinopril/hidroclorotiazida, felodipina, captopril, fumarato de bisoprolol.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la espondilitis anquilosante con los que se pueden combinar las proteínas de unión de la invención, incluyen los siguientes: ibuprofeno, diclofenaco y misoprostol, naproxeno, meloxicam, indometacina, diclofenaco, celecoxib, rofecoxib, sulfasalazina, metotrexato, azatioprina, minociclina, prednisona, etanercept, infliximab.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para el asma con los que se pueden combinar las proteínas de unión de la invención, incluyen los siguientes: albuterol, salmeterol/fluticasona, montelukast de sodio, propionato de fluticasona, budesonida, prednisona, xinafoato de salmeterol, HCl de levalbuterol, sulfato de albuterol/ipratropio, fosfato sódico de prednisolona, triamcinolona acetónido, dipropionato de beclometasona, bromuro de ipratropio,

- azitromicina, acetato de pirbuterol, prednisolona, teofilina anhidra, succinato sódico de metilprednisolona, claritromicina, zafirlukast, fumarato de formoterol, vacuna del virus de la gripe, metilprednisolona, trihidrato de amoxicilina, flunisolida, inyección para la alergia, cromoglicato sódico, clorhidrato de fexofenadina, flunisolida/mentol, amoxicilina/clavulanato, levofloxacina, dispositivo de inhalador, guaifenesina, fosfato sódico de dexametasona, HCl de moxifloxacina, hclato de doxiciclina, guaifenesina/d-metorfano, p-efedrina/cod/clorfenir, gatifloxacina, HCl de cetirizina, furoato de mometasona, xinafoato de salmeterol, benzonatato, cefalexina, pe/hidrocodona/clorfenir, HCl de cetirizina/pseudoefed, fenilefrina/cod/prometazina, codeína/prometazina, cefprozil, dexametasona, guaifenesina/pseudoefedrina, clorfeniramina/hidrocodona, nedocromilo de sodio, sulfato de terbutalina, epinefrina, metilprednisolona, sulfato de metaproterenol.
- 5 Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la EPOC con los que se pueden combinar las proteínas de unión de la invención, incluyen los siguientes: sulfato de albuterol/ipratropio, bromuro de ipratropio, salmeterol/fluticasona, albuterol, xinafoato de salmeterol, propionato de fluticasona, prednisona, teofilina anhidra, succinato sódico de metilprednisolona, montelukast sódico, budesonida, fumarato de formoterol, triamcinolona acetónido, levofloxacina, guaifenesina, azitromicina, dipropionato de beclometasona, HCl de levalbuterol, flunisolida, ceftriaxona sodio, trihidrato de amoxicilina, gatifloxacina, zafirlukast, amoxicilina/clavulanato, flunisolida/mentol, clorfeniramina/hidrocodona, sulfato de metaproterenol, metilprednisolona, furoato de mometasona, p-efedrina/cod/clorfenir, acetato de pirbuterol, p-efedrina/loratadina, sulfato de terbutalina, bromuro de tiotropio, (R,R)-formoterol, TgAAT, Cilomilast, Roflumilast.
- 10 Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la EPOC con los que se pueden combinar las proteínas de unión de la invención, incluyen los siguientes: sulfato de albuterol/ipratropio, bromuro de ipratropio, salmeterol/fluticasona, albuterol, xinafoato de salmeterol, propionato de fluticasona, prednisona, teofilina anhidra, succinato sódico de metilprednisolona, montelukast sódico, budesonida, fumarato de formoterol, triamcinolona acetónido, levofloxacina, guaifenesina, azitromicina, dipropionato de beclometasona, HCl de levalbuterol, flunisolida, ceftriaxona sodio, trihidrato de amoxicilina, gatifloxacina, zafirlukast, amoxicilina/clavulanato, flunisolida/mentol, clorfeniramina/hidrocodona, sulfato de metaproterenol, metilprednisolona, furoato de mometasona, p-efedrina/cod/clorfenir, acetato de pirbuterol, p-efedrina/loratadina, sulfato de terbutalina, bromuro de tiotropio, (R,R)-formoterol, TgAAT, Cilomilast, Roflumilast.
- 15 Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para el VHC con los que se pueden combinar las proteínas de unión de la invención, incluyen los siguientes: interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón-alfa con1, interferón-alfa-n1, interferón alfa-2a pegilado, interferón alfa-2b pegilado, ribavirina, Peginterferón alfa-2b + ribavirina, ácido ursodesoxicólico, ácido glicirrónico, Timalfasina, Maxamina, VX-497 y cualquiera de los compuestos que se utilizan para tratar el VHC mediante una acción con las siguientes dianas: polimerasa de VHC, proteasa de VHC, helicasa de VHC, IRES de VHC (sitio de entrada al ribosoma interno).
- 20 Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para el VHC con los que se pueden combinar las proteínas de unión de la invención, incluyen los siguientes: interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón-alfa con1, interferón-alfa-n1, interferón alfa-2a pegilado, interferón alfa-2b pegilado, ribavirina, Peginterferón alfa-2b + ribavirina, ácido ursodesoxicólico, ácido glicirrónico, Timalfasina, Maxamina, VX-497 y cualquiera de los compuestos que se utilizan para tratar el VHC mediante una acción con las siguientes dianas: polimerasa de VHC, proteasa de VHC, helicasa de VHC, IRES de VHC (sitio de entrada al ribosoma interno).
- 25 Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la fibrosis pulmonar idiopática con los que se pueden combinar las proteínas de unión de la invención, incluyen los siguientes: prednisona, azatioprina, albuterol, colchicina, sulfato de albuterol, digoxina, interferón gamma, metilprednisolona sod succ, lorazepam, furosemida, lisinopril, nitroglicerina, espirolactona, ciclofosfamida, bromuro de ipratropio, actinomicina D, alteplasa, propionato de fluticasona, levofloxacina, sulfato de metaproterenol, sulfato de morfina, HCl de oxidodona, cloruro de potasio, triamcinolona acetónido, tacrolímus anhidro, calcio, interferón-alfa, metotrexato, micofenolato de mofetilo, interferón-gamma-1β.
- 30 Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la fibrosis pulmonar idiopática con los que se pueden combinar las proteínas de unión de la invención, incluyen los siguientes: prednisona, azatioprina, albuterol, colchicina, sulfato de albuterol, digoxina, interferón gamma, metilprednisolona sod succ, lorazepam, furosemida, lisinopril, nitroglicerina, espirolactona, ciclofosfamida, bromuro de ipratropio, actinomicina D, alteplasa, propionato de fluticasona, levofloxacina, sulfato de metaproterenol, sulfato de morfina, HCl de oxidodona, cloruro de potasio, triamcinolona acetónido, tacrolímus anhidro, calcio, interferón-alfa, metotrexato, micofenolato de mofetilo, interferón-gamma-1β.
- 35 Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para el infarto de miocardio con los que se pueden combinar las proteínas de unión de la invención, incluyen los siguientes: aspirina, nitroglicerina, tartrato de metoprolol, enoxaparina sódica, heparina sódica, bisulfato de clopidogrel, carvedilol, atenolol, sulfato de morfina, succinato de metoprolol, warfarina sódica, lisinopril, mononitrato de isosorbida, digoxina, furosemida, simvastatina, ramipril, tenecteplasa, maleato de enalapril, torsemida, retavasa, losartán potásico, HCl de quinapril/mag carb, bumetanida, alteplasa, enalaprilato, clorhidrato de amiodarona, HCl de tirofiban m-hidrato, clorhidrato de diltiazem, captopril, irbesartán, valsartán, clorhidrato de propranolol, fosinopril sódico, clorhidrato de lidocaína, eptifibatida, cefazolina de sodio, sulfato de atropina, ácido aminocaproico, espirolactona, interferón, clorhidrato de sotalol, cloruro de potasio, docusato de sodio, HCl de dobutamina, alprazolam, pravastatina de sodio, atorvastatina de calcio, clorhidrato de midazolam, clorhidrato de meperidina, dinitrato de isosorbida, epinefrina, clorhidrato de dopamina, bivalirudina, rosuvastatina, ezetimiba/simvastatina, avasimiba, cariporida.
- 40 Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para el infarto de miocardio con los que se pueden combinar las proteínas de unión de la invención, incluyen los siguientes: aspirina, nitroglicerina, tartrato de metoprolol, enoxaparina sódica, heparina sódica, bisulfato de clopidogrel, carvedilol, atenolol, sulfato de morfina, succinato de metoprolol, warfarina sódica, lisinopril, mononitrato de isosorbida, digoxina, furosemida, simvastatina, ramipril, tenecteplasa, maleato de enalapril, torsemida, retavasa, losartán potásico, HCl de quinapril/mag carb, bumetanida, alteplasa, enalaprilato, clorhidrato de amiodarona, HCl de tirofiban m-hidrato, clorhidrato de diltiazem, captopril, irbesartán, valsartán, clorhidrato de propranolol, fosinopril sódico, clorhidrato de lidocaína, eptifibatida, cefazolina de sodio, sulfato de atropina, ácido aminocaproico, espirolactona, interferón, clorhidrato de sotalol, cloruro de potasio, docusato de sodio, HCl de dobutamina, alprazolam, pravastatina de sodio, atorvastatina de calcio, clorhidrato de midazolam, clorhidrato de meperidina, dinitrato de isosorbida, epinefrina, clorhidrato de dopamina, bivalirudina, rosuvastatina, ezetimiba/simvastatina, avasimiba, cariporida.
- 45 Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la psoriasis con los que se pueden combinar las proteínas de unión de la invención, incluyen los siguientes: inhibidor de molécula pequeña de KDR, inhibidor de molécula pequeña de Tie-2, calcipotrieno, propionato de clobetasol, triamcinolona acetónido, propionato de halobetasol, tazaroteno, metotrexato, fluocinonida, betametasona diprop aumentada, fluocinolona acetónido, acitretina, champú de alquitrán, valerato de betametasona, furoato de mometasona, ketoconazol, pramoxina/fluocinolona, valerato de hidrocortisona, flurandrenolida, urea, betametasona, propionato de clobetasol/emoll, propionato de fluticasona, azitromicina, hidrocortisona, fórmula hidratante, ácido fólico, desonida, pimecrolímus, alquitrán de hulla, diacetato de diflorasona, folato de etanercept, ácido láctico, metoxsalen, hc/bismuto subgal/znox/resor, acetato de metilprednisolona, prednisona, protector solar, halcinonida, ácido salicílico, antralina, pivalato de clocortolona, extracto de carbón, alquitrán de hulla/ácido salicílico, alquitrán de hulla/ácido salicílico/azufre, desoximetasona, diazepam, emoliente, fluocinonida/emoliente, aceite mineral/aceite de ricino/na lact, aceite mineral/aceite de cacahuete, petróleo/miristato de isopropilo, psoraleno, ácido salicílico, jabón/tribromsalán, timerosal/ácido bórico, celecoxib, infliximab, ciclosporina, alefacept, efalizumab, tacrolímus, pimecrolímus, PUVA, UVB, sulfasalazina.
- 50 Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la psoriasis con los que se pueden combinar las proteínas de unión de la invención, incluyen los siguientes: inhibidor de molécula pequeña de KDR, inhibidor de molécula pequeña de Tie-2, calcipotrieno, propionato de clobetasol, triamcinolona acetónido, propionato de halobetasol, tazaroteno, metotrexato, fluocinonida, betametasona diprop aumentada, fluocinolona acetónido, acitretina, champú de alquitrán, valerato de betametasona, furoato de mometasona, ketoconazol, pramoxina/fluocinolona, valerato de hidrocortisona, flurandrenolida, urea, betametasona, propionato de clobetasol/emoll, propionato de fluticasona, azitromicina, hidrocortisona, fórmula hidratante, ácido fólico, desonida, pimecrolímus, alquitrán de hulla, diacetato de diflorasona, folato de etanercept, ácido láctico, metoxsalen, hc/bismuto subgal/znox/resor, acetato de metilprednisolona, prednisona, protector solar, halcinonida, ácido salicílico, antralina, pivalato de clocortolona, extracto de carbón, alquitrán de hulla/ácido salicílico, alquitrán de hulla/ácido salicílico/azufre, desoximetasona, diazepam, emoliente, fluocinonida/emoliente, aceite mineral/aceite de ricino/na lact, aceite mineral/aceite de cacahuete, petróleo/miristato de isopropilo, psoraleno, ácido salicílico, jabón/tribromsalán, timerosal/ácido bórico, celecoxib, infliximab, ciclosporina, alefacept, efalizumab, tacrolímus, pimecrolímus, PUVA, UVB, sulfasalazina.
- 55 Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la artritis psoriásica con los que se pueden combinar las proteínas de unión de la invención, incluyen los siguientes: metotrexato, etanercept, rofecoxib, celecoxib, ácido fólico, sulfasalazina, naproxeno, leflunomida, acetato de metilprednisolona, indometacina, sulfato de hidroxicloroquina, prednisona, sulindaco, betametasona diprop aumentada, infliximab, metotrexato, folato, triamcinolona acetónido, diclofenaco, dimetilsulfóxido, piroxicam, diclofenaco sódico, ketoprofeno, meloxicam, metilprednisolona, nabumetona, tolmetina de sodio, calcipotriol, ciclosporina, diclofenaco de sodio/misoprostol, fluocinonida, sulfato de glucosamina, tiomalato sódico de oro, bitartrato de hidrocodona/apap, ibuprofeno,
- 60 Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la artritis psoriásica con los que se pueden combinar las proteínas de unión de la invención, incluyen los siguientes: metotrexato, etanercept, rofecoxib, celecoxib, ácido fólico, sulfasalazina, naproxeno, leflunomida, acetato de metilprednisolona, indometacina, sulfato de hidroxicloroquina, prednisona, sulindaco, betametasona diprop aumentada, infliximab, metotrexato, folato, triamcinolona acetónido, diclofenaco, dimetilsulfóxido, piroxicam, diclofenaco sódico, ketoprofeno, meloxicam, metilprednisolona, nabumetona, tolmetina de sodio, calcipotriol, ciclosporina, diclofenaco de sodio/misoprostol, fluocinonida, sulfato de glucosamina, tiomalato sódico de oro, bitartrato de hidrocodona/apap, ibuprofeno,

risedronato de sodio, sulfadiazina, tioguanina, valdecoxib, alefacept, efalizumab e inhibidores de bcl-2.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la reestenosis con los que se pueden combinar las proteínas de unión de la invención, incluyen los siguientes: sirolímús, paclitaxel, everolímús, tacrolímús, Zotarolímús, acetaminofeno.

- 5 Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la ciática con los que se pueden combinar las proteínas de unión de la invención, incluyen los siguientes: bitartrato de hidrocodona/apap, rofecoxib, HCl de ciclobenzaprina, metilprednisolona, naproxeno, ibuprofeno, HCl de oxidodona/paracetamol, celecoxib, valdecoxib, acetato de metilprednisolona, prednisona, fosfato de codeína/apap, HCl de tramadol/acetaminofeno, metaxalona, meloxicam, metocarbamol, clorhidrato de lidocaina, diclofenaco sódico, gabapentina, dexametasona, carisoprodol, ketorolaco
- 10 trometamina, indometacina, paracetamol, diazepam, nabumetona, HCl de oxidodona, HCl de tizanidina, diclofenaco de sodio/misoprostol, napsilato de propoxifeno/apap, asa/oxico/oxidodona ter, ibuprofeno/hidrocodona bit, HCl de tramadol, etodolaco, HCl de propoxifeno, HCl de amitriptilina, carisoprodol/codeína phos/asa, sulfato de morfina, multivitaminas, naproxeno de sodio, citrato de orfenadrina, temazepam.

- 15 Ejemplos de agentes terapéuticos para SLE (lupus) con los que se pueden combinar las proteínas de unión de la invención, incluyen los siguientes: AINEs, por ejemplo, diclofenaco, naproxeno, ibuprofeno, piroxicam, indometacina; inhibidores de COX2, por ejemplo, Celecoxib, rofecoxib, valdecoxib; medicamentos contra la malaria, por ejemplo, hidroxicloroquina; esteroides, por ejemplo, prednisona, prednisolona, budesonida, dexametasona; citotóxicos, por ejemplo, azatioprina, ciclofosfamida, micofenolato de mofetilo, metotrexato; inhibidores de PDE4 o inhibidor de la síntesis de purina, por ejemplo, Cellcept. Las proteínas de unión de la invención también pueden combinarse con
- 20 agentes tales como sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico, olsalazina, Imuran y agentes que interfieren con la síntesis, la producción o la acción de citocinas proinflamatorias tales como IL-1, por ejemplo, inhibidores de caspasa como inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 $\beta$  e IL-1ra. Las proteínas de unión de la invención también se pueden usar con inhibidores de la señalización de linfocitos T, por ejemplo, inhibidores de tirosina cinasa; o moléculas que se dirigen a moléculas de activación de linfocitos T, por ejemplo, CTLA-4-IgG o anticuerpos anti-familia B7, anticuerpos anti-familia PD-1. Las proteínas de unión de la invención se pueden combinar con IL-11 o
- 25 anticuerpos anti-citocinas, por ejemplo, fonotolizumab (anticuerpo anti-IFN $\gamma$ ), o anticuerpos anti-receptor, por ejemplo, anticuerpo anti-receptor de IL-6 y anticuerpos de moléculas de la superficie de linfocitos B. Los anticuerpos de la invención o una porción de los mismos que se une a antígeno también se pueden usar con LJP 394 (abetimús), agentes que agotan o inactivan los linfocitos B, por ejemplo, Rituximab (anticuerpo anti-CD20), linfoestat-B
- 30 (anticuerpo anti-BlyS), antagonistas de TNF, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF, Adalimumab (documento de publicación PCT n<sup>o</sup> WO 97/29131; HUMIRA<sup>®</sup>), CA2 (REMICADE<sup>®</sup>), CDP 571, estructuras artificiales de TNFR-Ig, (p75TNFR-IgG (ENBREL<sup>®</sup>) y p55TNFR-IgG (LENERCEPT<sup>®</sup>)) e inhibidores de bcl-2, porque se ha demostrado que una hiperexpresión de bcl-2 en ratones transgénicos causa un fenotipo similar a lupus (véase, Marquina et al., J. Immunol., 172(11): 7177-7185 (2004)), se espera, por lo tanto, que la inhibición tenga efectos terapéuticos.

- 35 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y periodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o una porción de anticuerpo puede ser determinada por una persona experta en la técnica y puede variar de acuerdo con factores
- 40 tales como el estado de enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo y la capacidad del anticuerpo o de la porción de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o de la porción de anticuerpo, se supera por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y periodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado profiláctico deseado.
- 45 Normalmente, ya que se emplea una dosis profiláctica en los sujetos antes o durante una etapa temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

- Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta deseada óptima (*por ejemplo*, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, un único bolo se puede administrar, varias dosis divididas se pueden administrar a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según esté
- 50 indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria tal y como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se van a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en
- 55 asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación de las formas de dosificación unitarias de la invención están dictadas y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular que se va a alcanzar y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la formulación de un compuesto activo de este tipo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

- Es de notar que los valores de la dosificación pueden variar según el tipo y la gravedad de la afección que se va a aliviar. Se entiende además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo según las necesidades individuales y el juicio profesional de la persona que
- 60

administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación establecidos en este documento son solamente a modo de ejemplo y no pretenden limitar el alcance o la puesta en práctica de la composición reivindicada.

### Diagnóstico

- 5 La presente descripción también proporciona aplicaciones de diagnóstico. Esto se explicará adicionalmente a continuación. Los anticuerpos que se unen a IL-1 $\beta$  de la invención se pueden emplear en cualquiera de una variedad de formatos para la detección de IL-1 $\beta$  *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo* (es decir, en células o tejidos que se han obtenido a partir de un individuo vivo, se han sometido a un procedimiento y luego han regresado al individuo). Las DVD-Igs de la invención ofrecen la ventaja adicional de ser capaces de unirse a un epítipo de IL-1 $\beta$ , así como a otros antígenos o epitopos en diversos formatos de ensayo de diagnóstico y de detección.

#### I. Método de Ensayo

- 15 La presente descripción también proporciona un método para determinar la presencia, la cantidad o la concentración de una IL-1 $\beta$ , o un fragmento de la misma, ("analito") en una muestra de ensayo, utilizando al menos una proteína de unión anti-IL-1 $\beta$  o una porción de la misma que se une a antígeno, que incluye una DVD-Ig, como se ha descrito en el presente documento. Se puede utilizar en el método cualquier ensayo adecuado tal y como se conoce en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, un inmunoensayo, tal como un inmunoensayo de tipo sándwich (por ejemplo, inmunoensayos monoclonales, policlonales y/o de tipo sándwich con DVD-Ig o cualquier variación de los mismos (por ejemplo, monoclonal/DVD-Ig, DVD-Ig/policlonal, etc.), incluyendo la detección con radioisótopos (radioinmunoensayo (RIA)) y la detección con enzimas (inmunoensayo enzimático (EIA) o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (por ejemplo, ensayos de ELISA Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota)), inmunoensayo de inhibición competitiva (por ejemplo, directo o inverso), inmunoensayo de polarización de la fluorescencia (FPIA), técnica de inmunoensayo con multiplicación de enzima (EMIT), transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) y ensayo quimioluminiscente homogéneo, etc. En un inmunoensayo basado en SELDI, un reactivo de captura que se une específicamente a un analito (o un fragmento del mismo) de interés, se fija a la superficie de una sonda de espectrometría de masas, tal como una matriz de chip de proteínas preactivadas. A continuación, el analito (o un fragmento del mismo) es capturado específicamente en el biochip y el analito capturado (o un fragmento del mismo) se detecta por espectrometría de masas. Alternativamente, el analito (o un fragmento del mismo) se puede eluir desde el reactivo de captura y se detecta por MALDI tradicional (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz) o por SELDI. Un inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscentes, en particular uno que emplea el analizador automatizado ARCHITECT<sup>®</sup> (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois), es un ejemplo de un inmunoensayo ejemplar.

- 35 Métodos bien conocidos en la técnica para la recogida, la manipulación y el procesamiento de orina, sangre, suero y plasma y otros fluidos corporales, se utilizan en la práctica de la presente descripción, por ejemplo, cuando se emplea una proteína de unión anti-IL-1 $\beta$  como se describe en el presente documento como reactivo de inmunodiagnóstico y/o en un kit de inmunoensayo de analitos. La muestra de ensayo puede comprender otros restos además del analito de interés, tales como anticuerpos, antígenos, haptenos, hormonas, fármacos, enzimas, receptores, proteínas, péptidos, polipéptidos, oligonucleótidos y/o polinucleótidos. Por ejemplo, la muestra puede ser una muestra de sangre completa obtenida a partir de un sujeto. Puede ser necesario o desearse que una muestra de ensayo, particularmente sangre completa, se trate antes del inmunoensayo tal y como se describe en el presente documento, por ejemplo, con un reactivo de pretratamiento. Incluso en los casos en los que no es necesario un tratamiento previo (por ejemplo, la mayoría de las muestras de orina), se puede realizar opcionalmente un tratamiento previo (por ejemplo, como parte de un régimen en una plataforma comercial).

- 45 El reactivo de pretratamiento puede ser cualquier reactivo apropiado para uso con el inmunoensayo y los kits de la invención. El pretratamiento comprende opcionalmente: (a) uno o varios disolventes (por ejemplo, metanol y etilenglicol) y, opcionalmente, sal, (b) uno o varios disolventes y sal, y opcionalmente, detergente, (c) detergente o (d) detergente y sal. Los reactivos de pretratamiento se conocen en la técnica y tal pretratamiento se puede emplear, por ejemplo, tal como se utiliza para ensayos sobre analizadores Abbott TDx, AxSYM<sup>®</sup> y ARCHITECT<sup>®</sup> (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois), como se describe en la bibliografía (véase, por ejemplo, Yatscoff et al., "Abbott TDx Monoclonal Antibody Assay Evaluated for Measuring Cyclosporine in Whole Blood", Clin. Chem., 36: 1969-1973 (1990); y Wallemacq et al., "Evaluation of the New AxSYM Cyclosporine Assay: Comparison with TDx Monoclonal Whole Blood and EMIT Cyclosporine Assays", Clin. Chem., 45: 432-435 (1999)), y/o como está disponible comercialmente. Además, el pretratamiento se puede realizar como se describe en los documentos de Patente de EE.UU. de Abbott n° 5.135.875; la publicación europea n° EP 0 471 293; la publicación PCT n° WO 2008/082984; y la publicación de EE.UU. n° 2008/0020401. El reactivo de pretratamiento puede ser un agente heterogéneo o un agente homogéneo.

- 60 Con el uso de un reactivo de pretratamiento heterogéneo, el reactivo de pretratamiento precipita la proteína que se une al analito (por ejemplo, la proteína que puede unirse a un analito o a un fragmento del mismo) presente en la muestra. Tal etapa de pretratamiento comprende la eliminación de cualquier proteína que se une al analito mediante la separación de la proteína que se une a analito precipitada, del material sobrenadante de la mezcla formada por la adición del agente de pretratamiento a la muestra. En tal ensayo, el material sobrenadante de la mezcla en ausencia

de cualquier proteína de unión, se utiliza en el ensayo, procediendo directamente a la etapa de captura de anticuerpos.

Con el uso de un reactivo de pretratamiento homogéneo no existe tal etapa de separación. Toda la mezcla de la muestra de ensayo y el reactivo de pretratamiento se ponen en contacto con un ligando específico marcado para el analito (o un fragmento del mismo), tal como un anticuerpo anti-analito marcado (o un fragmento antigénicamente reactivo del mismo). El reactivo de pretratamiento empleado para tal ensayo, normalmente se diluye en la mezcla de muestra de ensayo tratada previamente, ya sea antes o durante la captura con el primer ligando específico. A pesar de esa dilución, una cierta cantidad del reactivo de pretratamiento está todavía presente (o se mantiene) en la mezcla de muestra de ensayo durante la captura. De acuerdo con la invención, un ligando específico marcado a modo de ejemplo puede ser una DVD-Ig (o un fragmento, una variante o un fragmento de una variante de la misma).

En un formato heterogéneo, después de obtener la muestra de ensayo a partir de un sujeto, se prepara una primera mezcla. La mezcla contiene la muestra de ensayo en la que se está evaluando un analito (o un fragmento del mismo) y un primer ligando específico, en donde el primer ligando específico y cualquier analito contenido en la muestra de ensayo forman un complejo de primer ligando específico-analito. Preferiblemente, el primer ligando específico es un anticuerpo anti-analito o un fragmento del mismo. El primer ligando específico puede ser una DVD-Ig (o un fragmento, una variante o un fragmento de una variante de la misma) tal y como se describe en el presente documento. El orden en el que se añaden la muestra de ensayo y el primer ligando específico para formar la mezcla, no es decisivo. Preferiblemente, el primer ligando específico se inmoviliza sobre una fase sólida. La fase sólida utilizada en el inmunoensayo (para el primer ligando específico y, opcionalmente, el segundo ligando específico) puede ser cualquier fase sólida conocida en la técnica, tal como, pero no limitada a, una partícula magnética, una perla, un tubo de ensayo, una placa de microtitulación, una cubeta, una membrana, una molécula estructural, una película, un papel de filtro, un disco y un chip.

Después de formar la mezcla que contiene el complejo de primer ligando específico-analito, se elimina del complejo cualquier analito no unido usando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, el analito no unido se puede retirar mediante un lavado. Deseablemente, sin embargo, el primer ligando específico está presente en exceso para cualquier analito presente en la muestra de ensayo, de manera que todo el analito que está presente en la muestra de ensayo se une al primer ligando específico.

Después de eliminar todos los analitos no unidos, se añade un segundo ligando específico a la mezcla para formar un complejo de primer ligando específico-analito-segundo ligando específico. El segundo ligando específico es preferiblemente un anticuerpo anti-analito que se une a un epítipo sobre el analito que difiere del epítipo sobre el analito unido al primer ligando específico. Además, también preferiblemente, el segundo ligando específico está marcado o contiene un marcador detectable como se ha descrito anteriormente. El segundo ligando específico puede ser una DVD-Ig (o un fragmento, una variante o un fragmento de una variante de la misma) tal y como se describe en el presente documento.

Se puede emplear cualquier marcador detectable adecuado tal y como se conoce en la técnica. Por ejemplo, el marcador detectable puede ser un marcador radiactivo (tal como  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^1\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$  y  $^{33}\text{P}$ ), un marcador enzimático (como peroxidasa de rábano, peroxidasa alcalina, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y similares), un marcador quimioluminiscente (como ésteres de acridinio, tioésteres o sulfonamidas; luminol, isoluminol, ésteres de fenantridinio y similares), un marcador fluorescente (como fluoresceína (por ejemplo, 5-fluoresceína, 6-carboxifluoresceína, 3'-6-carboxifluoresceína, 5(6)-carboxifluoresceína, 6-hexaclorofluoresceína, 6-tetraclorofluoresceína, isotiocianato de fluoresceína y similares)), rodamina, ficobiliproteínas, R-ficoeritrina, puntos cuánticos (por ejemplo, seleniuro de cadmio con caperuzas de sulfuro de zinc), un marcador termométrico, o un marcador de reacción en cadena de inmuno-polimerasa. Una introducción a los marcadores, los procedimientos de marcado y la detección de marcadores se encuentra en Polak y Van Noorden, *Introduction to Immunocytochemistry*, 2ª ed., Springer Verlag, N.Y. (1997), y en Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (1996), que es un manual combinado y el catálogo publicado por Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon. Un marcador fluorescente se puede utilizar en FPIA (véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de EE.UU. nº 5.593.896; 5.573.904; 5.496.925; 5.359.093 y 5.352.803). Un compuesto de acridinio se puede utilizar como un marcador detectable en un ensayo de quimioluminiscencia homogéneo o heterogéneo (véase, por ejemplo, Adamczyk et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16: 1324-1328 (2006); Adamczyk et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14: 2313-2317 (2004); Adamczyk et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14: 3917-3921 (2004); y Adamczyk et al., *Org. Lett.*, 5: 3779-3782 (2003)).

Un compuesto de acridinio a modo de ejemplo es un acridinio-9-carboxamida. Los métodos para preparar acridinio 9-carboxamidas se describen en Mattingly, J. *Biodumin. Chemidumin.*, 6: 107-114 (1991); Adamczyk et al., *J. Org. Chem.*, 63: 5636-5639 (1998); Adamczyk et al., *Tetrahedron*, 55: 10899-10914 (1999); Adamczyk et al., *Org. Lett.*, 1: 779-781 (1999); Adamczyk et al., *Bioconjugate Chem.*, 11: 714-724 (2000); Adamczyk y Mattingly, *En Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications*; (Dyke, K.V., compilador) (CRC Press: Boca Raton, 2002) pp. 77-105; Adamczyk et al., *Org. Lett.*, 5: 3779-3782 (2003); y los documentos de Patente de EE.UU. nº 5.468.646, 5.543.524 y 5.783.699. Otro compuesto de acridinio preferido es un éster de arilo de acridinio-9-carboxilato. Un ejemplo de un éster de arilo de acridinio-9-carboxilato es fluorosulfonato de 10-metil-9-(fenoxicarbonil)acridinio (disponible en Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan). Los métodos para preparar ésteres de arilo de acridinio-9-carboxilato se

describen en McCapra et al., Photochem. Photobiol., 4: 1111-21 (1965); Razavi et al., Luminescence, 15: 245-249 (2000); Razavi et al., Luminescence, 15: 239-244 (2000); y el documento de Patente de EE.UU. nº 5.241.070. Otros detalles con respecto al éster de arilo de acridinio-9-carboxilato y su uso se exponen en el documento de Publicación de EE.UU. nº 2008/0248493.

5 Los ensayos quimioluminiscentes (por ejemplo, empleando acridinio como se ha descrito anteriormente u otros agentes quimioluminiscentes) se pueden realizar de acuerdo con los métodos descritos en Adamczyk et al., Anal. Chim. Acta, 579(1): 61-67 (2006). Aunque se puede utilizar cualquier formato de ensayo adecuado, un quimioluminómetro de microplacas (Mithras LB-940, Berthold Technologies USA., LLC, Oak Ridge, Tennessee) permite el ensayo de múltiples muestras de pequeños volúmenes rápidamente.

10 El orden en que se añade la muestra de ensayo y el o los ligandos específicos para formar la mezcla para el ensayo quimioluminiscente no es decisivo. Si el primer ligando específico está marcado detectablemente con un agente quimioluminiscente tal como un compuesto de acridinio, se forman complejos de primer ligando específico-analito marcados de forma detectable. Alternativamente, si se utiliza un segundo ligando específico y el segundo ligando específico está marcado de manera detectable con un agente quimioluminiscente tal como un compuesto de acridinio, se forman complejos de primer ligando específico-analito-segundo ligando específico marcados de forma detectable. Cualquier ligando específico que no esté unido, marcado o sin marcar, se puede retirar de la mezcla usando cualquier método conocido en la técnica, tal como el lavado.

El peróxido de hidrógeno se puede generar *in situ* en la mezcla o se proporciona o se suministra a la mezcla (por ejemplo, siendo la fuente del peróxido de hidrógeno uno o varios tampones u otras soluciones que se sabe que contienen peróxido de hidrógeno) antes, simultáneamente o después de la adición de un compuesto de acridinio descrito anteriormente. El peróxido de hidrógeno se pueden generar *in situ* en una variedad de formas como será evidente para un experto en la técnica.

Después de la adición simultánea o posterior de al menos una solución básica a la muestra, se genera una señal detectable, es decir, una señal quimioluminiscente, indicativa de la presencia del analito. La solución básica contiene al menos una base y tiene un pH mayor o igual a 10, preferiblemente, mayor o igual a 12. Ejemplos de soluciones básicas incluyen, pero no se limitan a, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de amonio, hidróxido de magnesio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, hidróxido de calcio, carbonato de calcio y bicarbonato de calcio. La cantidad de solución básica añadida a la muestra depende de la concentración de la solución básica. Basándose en la concentración de la solución básica empleada, un experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad de solución básica que hay que añadir a la muestra.

La señal quimioluminiscente que se genera se puede detectar utilizando métodos de rutina conocidos por los expertos en la técnica. Basándose en la intensidad de la señal generada, se puede cuantificar la cantidad de analito en la muestra. Específicamente, la cantidad de analito en la muestra es proporcional a la intensidad de la señal generada. La cantidad de analito presente se puede cuantificar comparando la cantidad de luz generada con una curva estándar para el analito o comparando con un patrón de referencia. La curva estándar se puede generar utilizando diluciones en serie o soluciones de concentraciones conocidas de analito mediante espectroscopia de masas, métodos gravimétricos y otros métodos conocidos en la técnica. Si bien lo anterior se describe haciendo énfasis en el uso de un compuesto de acridinio como agente quimioluminiscente, un experto ordinario en la técnica puede adaptar fácilmente esta descripción para el uso de otros agentes quimioluminiscentes.

40 Los inmunoensayos de analitos generalmente pueden realizarse usando cualquier formato conocido en la técnica, tal como, pero no limitado a, un formato de tipo sándwich. En concreto, en un formato de inmunoensayo se emplean al menos dos anticuerpos para separar y cuantificar el analito, tal como un analito humano, o un fragmento del mismo en una muestra. Más específicamente, al menos dos de los anticuerpos se unen a diferentes epítomos en un analito (o en un fragmento del mismo) formando un complejo inmune, que se conoce como un "sándwich".

45 Generalmente, en los inmunoensayos se pueden utilizar uno o varios anticuerpos para capturar el analito (o un fragmento del mismo) en la muestra de ensayo (estos anticuerpos se denominan con frecuencia un anticuerpo de "captura" o anticuerpos de "captura") y se pueden utilizar uno o varios anticuerpos para unir un marcador detectable (es decir, cuantificable) al sándwich (estos anticuerpos se denominan con frecuencia el "anticuerpo de detección", los "anticuerpos de detección", el "conjugado" o los "conjugados"). Por lo tanto, en el contexto de un formato de inmunoensayo de tipo sándwich, una DVD-Ig (o un fragmento, una variante o un fragmento de una variante de la misma) tal y como se describe en el presente documento, se puede utilizar como anticuerpo de captura, anticuerpo de detección o ambas cosas. Por ejemplo, una DVD-Ig que tiene un dominio que se puede unir a un primer epítomo en un analito (o en un fragmento del mismo) se puede utilizar como anticuerpo de captura, y/u otra DVD-Ig que tiene un dominio que puede unirse a un segundo epítomo en un analito (o en un fragmento del mismo) se puede utilizar como anticuerpo de detección. En este sentido, una DVD-Ig que tiene un primer dominio que se puede unir a un primer epítomo en un analito (o en un fragmento del mismo) y un segundo dominio que puede unirse a un segundo epítomo en un analito (o en un fragmento del mismo), se puede utilizar como anticuerpo de captura y/o anticuerpo de detección. Alternativamente, una DVD-Ig que tiene un primer dominio que se puede unir a un epítomo en un primer analito (o en un fragmento del mismo) y un segundo dominio que se puede unir a un epítomo en un segundo analito (o en un fragmento del mismo) se puede utilizar como anticuerpo de captura y/o anticuerpo de detección para detectar y opcionalmente cuantificar, dos o más analitos. En el caso de que un analito pueda estar presente en una

muestra en más de una forma, tal como una forma monomérica y una forma dimérica/multimérica, que puede ser homomérica o heteromérica, una DVD-Ig que tiene un dominio que se puede unir a un epítipo que solo se expone en la forma monomérica y otra DVD-Ig que tiene un dominio que se puede unir a un epítipo en una parte diferente de una forma dimérica/multimérica, se pueden usar como anticuerpos de captura y/o anticuerpos de detección, permitiendo de este modo la detección y cuantificación opcional, de diferentes formas de un analito dado. Además, el empleo de DVD-Igs con afinidades diferenciales dentro de una única DVD-Ig y/o entre DVD-Igs puede proporcionar una ventaja en la avidéz. En el contexto de los inmunoensayos tal y como se describen en el presente documento, por lo general puede ser útil o deseado incorporar uno o varios enlazadores dentro de la estructura de una DVD-Ig. Cuando está presente, de manera óptima, el enlazador debe tener una longitud suficiente y una flexibilidad estructural para permitir la unión de un epítipo a través de los dominios internos, así como la unión de otro epítipo a través de los dominios externos. En este sentido, si una DVD-Ig se puede unir a dos analitos diferentes y un analito es más grande que el otro, de manera deseable el analito más grande se une a través de los dominios externos.

En general, una muestra que está siendo sometida a ensayo para estudiar la presencia (por ejemplo, se sospecha que contiene) de una proteína IL-1 $\beta$  (o un fragmento de la misma), se puede poner en contacto con al menos un anticuerpo (o anticuerpos) de captura y al menos un anticuerpo de detección (que puede ser un segundo anticuerpo de detección o un tercer anticuerpo de detección, o incluso un anticuerpo numerado sucesivamente, por ejemplo, como cuando el anticuerpo de captura y/o de detección comprende múltiples anticuerpos) de forma simultánea o secuencial y en cualquier orden. Por ejemplo, la muestra de ensayo se puede poner en contacto primero con al menos un anticuerpo de captura y luego (secuencialmente) con al menos un anticuerpo de detección. Alternativamente, la muestra de ensayo se puede poner en contacto primero con al menos un anticuerpo de detección y, a continuación (secuencialmente) con al menos un anticuerpo de captura. En aún otra alternativa, la muestra de ensayo se puede poner en contacto simultáneamente con un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección.

En el formato de ensayo de tipo sándwich, una muestra sospechosa de contener IL-1 $\beta$  (o un fragmento de la misma) se pone primero en contacto con al menos una primera proteína de unión de captura (por ejemplo, anticuerpo de IL-1 $\beta$ ) en condiciones que permiten la formación de un primer complejo de proteína de unión/IL-1 $\beta$ . Si se utiliza más de una proteína de unión de captura, se forma un primer complejo de proteína de unión de captura/IL-1 $\beta$  que comprende dos o más formas de proteínas de unión de captura. En un ensayo de tipo sándwich, las proteínas de unión, es decir, preferiblemente, al menos una proteína de unión de captura, se utilizan en cantidades en exceso molar sobre la cantidad máxima de analito IL-1 $\beta$  (o un fragmento del mismo) que se espera en la muestra de ensayo. Por ejemplo, se puede utilizar desde aproximadamente 5  $\mu$ g hasta aproximadamente 1 mg de anticuerpo por mL de tampón (por ejemplo, tampón de recubrimiento de micropartículas).

Los inmunoensayos de inhibición competitiva, que frecuentemente se utilizan para medir analitos pequeños porque se requiere la unión a un solo anticuerpo, comprenden formatos secuenciales y clásicos. En un inmunoensayo de inhibición competitiva secuencial, una proteína de unión de captura para IL-1 $\beta$  se reviste sobre un pocillo de una placa de microtitulación u otro soporte sólido. Cuando se añade la muestra que contiene la IL-1 $\beta$  al pocillo, la IL-1 $\beta$  se une a la proteína de unión de captura. Después del lavado, se añade una cantidad conocida de IL-1 $\beta$  marcada (por ejemplo, biotina o peroxidasa de rábano picante (HRP)) al pocillo. Es necesario un sustrato para que un marcador enzimático genere una señal. Un ejemplo de un sustrato adecuado para HRP es 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). Después del lavado, la señal generada por el analito marcado se mide y es inversamente proporcional a la cantidad de IL-1 $\beta$  en la muestra. En un inmunoensayo de inhibición competitiva clásico, una proteína de unión para IL-1 $\beta$  se reviste sobre un soporte sólido (por ejemplo, un pocillo de una placa de microtitulación). Sin embargo, a diferencia del inmunoensayo de inhibición competitiva secuencial, la muestra y la IL-1 $\beta$  marcada se añaden al pocillo al mismo tiempo. Cualquier IL-1 $\beta$  en la muestra compite con la IL-1 $\beta$  marcada para unirse a la proteína de unión de captura. Después del lavado, la señal generada por la IL-1 $\beta$  marcada se mide y es inversamente proporcional a la cantidad de IL-1 $\beta$  en la muestra.

Opcionalmente, antes de poner en contacto la muestra de ensayo con al menos una proteína de unión de captura (por ejemplo, el primer anticuerpo de captura), la al menos una proteína de unión de captura se puede unir a un soporte sólido, lo que facilita la separación del primer complejo de proteína de unión/IL-1 $\beta$  (o un fragmento de la misma) de la muestra de ensayo. El sustrato al que se une la proteína de unión de captura puede ser cualquier soporte sólido adecuado o fase sólida que facilita la separación del complejo anticuerpo de captura-analito de la muestra.

Los ejemplos incluyen un pocillo de una placa, tal como una placa de microtitulación, un tubo de ensayo, un gel poroso (por ejemplo, gel de sílice, agarosa, dextrano o gelatina), una película polimérica (por ejemplo, poliacrilamida), perlas (por ejemplo, perlas de poliestireno o perlas magnéticas), una tira de un filtro/membrana (por ejemplo, nitrocelulosa o nailon), micropartículas (por ejemplo, partículas de látex, micropartículas magnetizables (por ejemplo, micropartículas que tienen núcleos de óxido férrico u óxido de cromo y recubrimientos homopoliméricos o heteropoliméricos y radios de aproximadamente 1-10 micras). El sustrato puede comprender un material poroso adecuado con una afinidad de superficie adecuada para unirse a antígenos y suficiente porosidad para permitir el acceso mediante anticuerpos de detección. Se prefiere generalmente un material microporoso, aunque se puede utilizar un material gelatinoso en estado hidratado. Tales sustratos porosos están preferiblemente en forma de



láminas que tienen un espesor de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 mm, preferiblemente de aproximadamente 0,1 mm. Aunque el tamaño de poro puede variar un poco, preferiblemente el tamaño de poro es de aproximadamente 0,025 a aproximadamente 15 micras, más preferiblemente de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 15 micras. La superficie de tales sustratos puede activarse por procesos químicos que causan la unión covalente de un anticuerpo con el sustrato. La unión irreversible, en general se produce mediante adsorción a través de fuerzas hidrófobas, del antígeno o del anticuerpo con el sustrato; alternativamente, se puede emplear un agente de acoplamiento químico u otros medios para unir covalentemente el anticuerpo con el sustrato, a condición de que tal unión no interfiera con la capacidad del anticuerpo para unirse al analito. Alternativamente, el anticuerpo puede estar unido con micropartículas, que se han recubierto previamente con estreptavidina (por ejemplo, perlas magnéticas DYNAL<sup>®</sup>, Invitrogen, Carlsbad, California) o biotina (por ejemplo, usando micropartículas recubiertas con estreptavidina Power-Bind<sup>TM</sup>-SA-MP (Seradyn, Indianapolis, Indiana)) o anticuerpos monoclonales específicos anti-especie. Si es necesario, el sustrato se puede derivatizar para permitir la reactividad con distintos grupos funcionales en el anticuerpo. Tal derivatización requiere el uso de ciertos agentes de acoplamiento, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, anhídrido maleico, N-hidroxisuccinimida y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida. Si se desea, uno o varios reactivos de captura, tales como anticuerpos (o fragmentos de los mismos), cada uno de los cuales es específico del o los analitos, se pueden fijar a fases sólidas en diferentes ubicaciones físicas o direccionables (por ejemplo, tal como en una configuración de biochip (véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de EE.UU. n° 6.225.047; publicación PCT n° WO 99/51773; Patente de EE.UU. n° 6.329.209; publicación PCT n° WO 00/56934; y Patente de EE.UU. n° 5.242.828)). Si el reactivo de captura se fija a una sonda de espectrometría de masas como soporte sólido, la cantidad de analito unido a la sonda se puede detectar mediante espectrometría de masas con desorción ionización mediante láser. Alternativamente, una sola columna puede estar empacutada con diferentes perlas, que se derivatizan con uno o varios de los reactivos de captura, capturando de este modo el analito en un solo lugar (véase, tecnologías basadas en perlas, derivatizadas con anticuerpos, por ejemplo, la tecnología xMAP de Luminex (Austin, Texas)).

Después de haber sometido a ensayo la muestra de ensayo para el analito (o un fragmento del mismo) se pone en contacto con al menos un anticuerpo de captura (por ejemplo, el primer anticuerpo de captura), se incuba la mezcla con el fin de permitir la formación de un complejo de primer anticuerpo (o anticuerpo múltiple)-analito (o un fragmento del mismo). La incubación puede llevarse a cabo a un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 10,0, a una temperatura entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 45°C y durante un periodo de al menos aproximadamente un (1) minuto hasta aproximadamente dieciocho (18) horas, preferiblemente desde aproximadamente 1 a aproximadamente 24 minutos, lo más preferiblemente desde aproximadamente 4 a aproximadamente 18 minutos. El inmunoensayo descrito en este documento puede llevarse a cabo en una sola etapa (es decir, la muestra de ensayo, al menos un anticuerpo de captura y al menos un anticuerpo de detección se añaden todos secuencial o simultáneamente a un recipiente de reacción) o en más de una etapa, tal como dos etapas, tres etapas, etc.

Después de la formación del complejo de (primer o múltiple) anticuerpo de captura/analito (o un fragmento del mismo), el complejo se pone en contacto con al menos un anticuerpo de detección en condiciones que permiten la formación de un complejo de (primer o múltiple) anticuerpo de captura/analito (o un fragmento del mismo)/segundo anticuerpo de detección. Aunque se denomina "segundo" anticuerpo para mayor claridad (por ejemplo, segundo anticuerpo de detección), de hecho, cuando se usan múltiples anticuerpos para la captura y/o la detección, el al menos un anticuerpo de detección puede ser el segundo, tercero, cuarto, etc. anticuerpo usado en el inmunoensayo. Si el complejo de anticuerpo de captura/analito (o un fragmento del mismo) se pone en contacto con más de un anticuerpo de detección, a continuación, se forma un complejo de (primer o múltiple) anticuerpo de captura/analito (o un fragmento del mismo)/(múltiple) anticuerpo de detección. Al igual que con el anticuerpo de captura (por ejemplo, el primer anticuerpo de captura), cuando el al menos un (por ejemplo, segundo y cualquiera posterior) anticuerpo de detección se pone en contacto con el complejo de anticuerpo de captura/analito (o un fragmento del mismo), se requiere un período de incubación en condiciones similares a las descritas anteriormente para la formación del complejo de (primer o múltiple) anticuerpo de captura/analito (o un fragmento del mismo)/(segundo o múltiple) anticuerpo de detección. Preferiblemente, al menos un anticuerpo de detección contiene un marcador detectable. El marcador detectable puede estar unido a al menos un anticuerpo de detección (por ejemplo, el segundo anticuerpo de detección) antes, simultáneamente o después de la formación del complejo de (primer o múltiple) anticuerpo de captura/analito (o un fragmento del mismo)/(segundo o múltiple) anticuerpo de detección. Se puede emplear cualquier marcador detectable conocido en la técnica (véase, la descripción más arriba, incluyendo las referencias de Polak y Van Noorden (1997) y Haugland (1996)).

El marcador detectable puede estar unido a los anticuerpos, ya sea directamente o a través de un agente de acoplamiento. Un ejemplo de agente de acoplamiento que se puede utilizar es EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, clorhidrato), que está disponible comercialmente en Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri. Otros agentes de acoplamiento que se pueden utilizar son conocidos en la técnica. Los métodos para unir un marcador detectable a un anticuerpo son conocidos en la técnica. Además, muchos marcadores detectables se pueden comprar o sintetizar, los cuales ya contienen grupos terminales que facilitan el acoplamiento del marcador detectable con el anticuerpo, tales como CPSP-éster de acridinio (es decir, 9-[N-tosil-N-(3-carboxipropil)]-10-(3-sulfopropil)acridinio carboxamida) o PAPS-éster de acridinio (es decir, N10-(3-sulfopropil)-N-(3-sulfopropil)-acridinio-9-carboxamida).

El complejo de (primer o múltiple) anticuerpo de captura/analito/(segundo o múltiple) anticuerpo de detección puede

estar separado, pero no tiene que estarlo, del resto de la muestra de ensayo antes de la cuantificación del marcador. Por ejemplo, si el al menos un anticuerpo de captura (por ejemplo, el primer anticuerpo de captura) se une a un soporte sólido, tal como un pocillo o una perla, la separación se puede lograr mediante la eliminación del fluido (de la muestra de ensayo) del contacto con el soporte sólido. Alternativamente, si el al menos un primer anticuerpo de captura se une a un soporte sólido, se puede poner en contacto simultáneamente con la muestra que contiene el analito y el al menos segundo anticuerpo de detección para formar un complejo de primer (múltiple) anticuerpo/analito/segundo (múltiple) anticuerpo, seguido de la eliminación del fluido (muestra de ensayo) del contacto con el soporte sólido. Si el al menos un primer anticuerpo de captura no está unido a un soporte sólido, a continuación el complejo del (primer o múltiple) anticuerpo de captura/analito/(segundo o múltiple) anticuerpo de detección no tiene que ser retirado de la muestra de ensayo para cuantificar la cantidad de marcador.

Después de la formación del complejo marcado de anticuerpo de captura/analito/anticuerpo de detección (por ejemplo, el complejo de primer anticuerpo de captura/analito/segundo anticuerpo de detección), la cantidad de marcador en el complejo se cuantifica usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, si se utiliza un marcador enzimático, el complejo marcado reacciona con un sustrato para el marcador que proporciona una reacción cuantificable tal como el desarrollo de color. Si el marcador es un marcador radiactivo, el marcador se cuantifica usando medios apropiados, tales como un recuento del centelleo. Si el marcador es un marcador fluorescente, el marcador se cuantifica mediante la estimulación del marcador con luz de un color (que se conoce como la "longitud de onda de excitación") y la detección de otro color (que se conoce como la "longitud de onda de emisión") que es emitida por el marcador como respuesta a la estimulación. Si el marcador es un marcador quimioluminiscente, el marcador se cuantifica mediante la detección de la luz emitida ya sea visualmente o mediante el uso de luminómetros, rayos X, película fotográfica de alta velocidad, una cámara CCD, etc. Una vez que se ha cuantificado la cantidad de marcador en el complejo, se determina la concentración de analito o de un fragmento del mismo en la muestra de ensayo por medios adecuados, tales como mediante el uso de una curva estándar que se ha generado utilizando diluciones en serie de analito o de un fragmento del mismo, de concentración conocida. Aparte del uso de diluciones en serie de analito o de un fragmento del mismo, la curva estándar se puede generar por gravimetría, mediante espectroscopía de masas y por otros métodos conocidos en la técnica.

En un ensayo de micropartículas quimioluminiscentes que emplea el analizador ARCHITECT<sup>®</sup>, el pH del diluyente conjugado debe ser de aproximadamente 6,0 +/- 0,2, el tampón de recubrimiento de micropartículas debe mantenerse a aproximadamente la temperatura ambiente (es decir, desde aproximadamente 17°C hasta aproximadamente 27°C), el pH del tampón de recubrimiento de micropartículas debe ser aproximadamente 6,5 +/- 0,2 y el pH del diluyente de micropartículas debe ser de aproximadamente 7,8 +/- 0,2. Los sólidos son preferiblemente menos de aproximadamente el 0,2%, tal como menos de aproximadamente el 0,15%, menos de aproximadamente el 0,14%, menos de aproximadamente el 0,13%, menos de aproximadamente el 0,12% o menos de aproximadamente el 0,11%, tal como aproximadamente el 0,10%.

Los FPIAs se basan en los principios del inmunoensayo de unión competitiva. Un compuesto marcado con fluorescencia, cuando es excitado por una luz polarizada linealmente, emitirá fluorescencia que tiene un grado de polarización inversamente proporcional a su tasa de rotación. Cuando un complejo trazador-anticuerpo marcado con fluorescencia es excitado por una luz polarizada linealmente, la luz emitida permanece altamente polarizada porque el fluoróforo está obligado a rotar entre el tiempo en que la luz es absorbida y el tiempo en que la luz se emite. Cuando un compuesto trazador "libre" (es decir, un compuesto que no está unido a un anticuerpo) es excitado por luz polarizada linealmente, su rotación es mucho más rápida que la del conjugado correspondiente de trazador-anticuerpo, producido en un inmunoensayo de unión competitiva. Los FPIAs son ventajosos sobre los RIAs en la medida en que no hay sustancias radiactivas que requieran una manipulación y eliminación especial. Además, los FPIAs son ensayos homogéneos que pueden realizarse de forma fácil y rápida.

De cara a lo anterior, se proporciona un método para determinar la presencia, la cantidad o la concentración de analito (o de un fragmento del mismo) en una muestra de ensayo. El método comprende someter a ensayo la muestra de ensayo para analizar un analito (o un fragmento del mismo) mediante un ensayo (i) que emplea (i') al menos uno entre un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo que puede unirse a un analito, una variante de un anticuerpo que puede unirse a un analito, un fragmento de una variante de un anticuerpo que puede unirse a un analito y una DVD-Ig (o un fragmento, una variante o un fragmento de una variante de la misma) que puede unirse a un analito y (ii') al menos un marcador detectable y (ii) que comprende la comparación de una señal generada por el marcador detectable como una indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración de analito (o de un fragmento del mismo) en la muestra de ensayo para una señal generada como una indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración de analito (o de un fragmento del mismo) en un control o calibrador. El calibrador es opcionalmente una parte de una serie de calibradores, en donde cada uno de los calibradores se diferencia de los otros calibradores por la concentración de analito.

El método puede comprender (i) poner en contacto la muestra de ensayo con al menos un primer ligando específico para el analito (o un fragmento del mismo) seleccionado a partir del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo que puede unirse a un analito, una variante de un anticuerpo que puede unirse a un analito, un fragmento de una variante de un anticuerpo que puede unirse a un analito y una DVD-Ig (o un fragmento, una variante o un fragmento de una variante de la misma) que puede unirse a un analito, a fin de formar un complejo de primer ligando específico/analito (o un fragmento del mismo), (ii) poner en contacto el complejo de primer ligando

específico/analito (o un fragmento del mismo) con al menos un segundo ligando específico del analito (o un fragmento del mismo) seleccionado a partir del grupo que consiste en un anticuerpo anti-analito marcado de forma detectable, un fragmento marcado de forma detectable de un anticuerpo anti-analito que puede unirse al analito, una variante marcada de forma detectable de un anticuerpo anti-analito que puede unirse al analito, un fragmento marcado de forma detectable de una variante de un anticuerpo anti-analito que puede unirse al analito y una DVD-Ig marcada de forma detectable (o un fragmento, una variante o un fragmento de una variante de la misma), con el fin de formar un complejo de primer ligando específico/analito (o un fragmento del mismo)/segundo ligando específico, y (iii) determinar la presencia, cantidad o concentración de analito en la muestra de ensayo mediante la detección o la medición de la señal generada por el marcador detectable en el complejo de primer ligando específico/analito (o un fragmento del mismo)/segundo ligando específico formado en (ii). Se puede preferir un método en el que al menos un primer ligando específico (o un fragmento del mismo) y/o al menos un segundo ligando específico (o un fragmento del mismo) es una DVD-Ig (o un fragmento, una variante o un fragmento de una variante de la misma) como se describe en el presente documento.

Alternativamente, el método puede comprender poner en contacto la muestra de ensayo con al menos un primer ligando específico para un analito IL-1 $\beta$  (o un fragmento del mismo) seleccionado a partir del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo que puede unirse a un analito, una variante de un anticuerpo que puede unirse a un analito, un fragmento de una variante de un anticuerpo que puede unirse a un analito y una DVD-Ig (o un fragmento, una variante o un fragmento de una variante de la misma) y, simultánea o secuencialmente, en cualquier orden, poner en contacto la muestra de ensayo con al menos un segundo ligando específico, que puede competir con el analito (o un fragmento del mismo) en la unión a al menos un primer ligando específico y que se selecciona a partir del grupo que consiste en un analito marcado de forma detectable, un fragmento de analito marcado de forma detectable que puede unirse al primer ligando específico, una variante de analito marcada de forma detectable que puede unirse al primer ligando específico y un fragmento de una variante de analito marcado de forma detectable que puede unirse al primer ligando específico. Cualquier IL-1 $\beta$  (o un fragmento de la misma) presente en la muestra de ensayo y al menos un segundo ligando específico compiten entre sí para formar un complejo de primer ligando específico/analito (o un fragmento del mismo) y un complejo de primer ligando específico/segundo ligando específico, respectivamente. El método comprende además determinar la presencia, cantidad o concentración de analito en la muestra de ensayo mediante una detección o medición de la señal generada por el marcador detectable en el complejo de primer ligando específico/segundo ligando específico formado en (ii), en donde la señal generada por el marcador detectable en el complejo de primer ligando específico/segundo ligando específico es inversamente proporcional a la cantidad o la concentración de analito en la muestra de ensayo.

Los métodos anteriores pueden comprender además diagnosticar, pronosticar o evaluar la eficacia de un tratamiento terapéutico/profiláctico de un paciente a partir del cual se obtuvo la muestra de ensayo. Si el método comprende además la evaluación de la eficacia de un tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente a partir del cual se obtuvo la muestra de ensayo, el método comprende además opcionalmente modificar el tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente según sea necesario para mejorar la eficacia. El método se puede adaptar para uso en un sistema automatizado o en un sistema semiautomatizado.

Con respecto a los métodos de ensayo (y un kit para los mismos), puede ser posible emplear anticuerpos anti-analito disponibles comercialmente o métodos para la producción de anti-analito, tal y como se han descrito en la bibliografía. Proveedores comerciales de diversos anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, California), GenWay Biotech, Inc. (San Diego, California) y R&D Systems (RDS; Minneapolis, Minnesota).

Generalmente, se puede emplear un nivel predeterminado como punto de referencia para evaluar los resultados obtenidos después de someter a ensayo una muestra de ensayo para un analito o un fragmento del mismo, por ejemplo, para la detección de una enfermedad o el riesgo de enfermedad. Generalmente, al realizar tal comparación, el nivel predeterminado se obtiene mediante la ejecución de un ensayo particular un número de veces suficiente y en condiciones apropiadas, de tal manera que se puede establecer una relación o una asociación de la presencia, cantidad o concentración de un analito con un estadio particular o un criterio de valoración de una enfermedad, un trastorno o una afección, o con indicios clínicos particulares. Normalmente, el nivel predeterminado se obtiene con ensayos de los sujetos de referencia (o poblaciones de sujetos). El analito medido puede incluir fragmentos del mismo, productos de degradación del mismo y/o productos de escisión enzimática del mismo.

En particular, con respecto a un nivel predeterminado, tal y como se emplea para vigilar la progresión y/o el tratamiento de una enfermedad, la cantidad o la concentración de analito o de un fragmento del mismo puede estar "sin cambios", ser "favorable" (o "favorablemente alterada"), o "desfavorable" (o "desfavorablemente alterada"). "Elevada" o "incrementada" se refiere a una cantidad o una concentración en una muestra de ensayo que es más alta que un nivel o intervalo típico o normal (por ejemplo, un nivel predeterminado), o es más alta que otro nivel o intervalo de referencia (por ejemplo, una muestra anterior o de referencia). El término "disminuida" o "reducida" se refiere a una cantidad o una concentración en una muestra de ensayo que es menor que un nivel o un intervalo típico o normal (por ejemplo, un nivel predeterminado), o es más baja que otro nivel o intervalo de referencia (por ejemplo, una muestra anterior o de referencia). El término "alterada" se refiere a una cantidad o una concentración en una muestra que está alterada (aumentada o reducida) sobre un nivel o intervalo típico o normal (por ejemplo, un

nivel predeterminado), o sobre otro nivel o intervalo de referencia (por ejemplo, una muestra anterior o de referencia).

El nivel o intervalo típico o normal para un analito se define de acuerdo con la práctica convencional. Debido a que los niveles de analito en algunos casos serán muy bajos, un nivel denominado alterado o una alteración se puede considerar que se ha producido cuando hay cualquier cambio neto, en comparación con el nivel o el intervalo típico o normal, o el nivel o intervalo de referencia, que no se puede explicar por un error experimental o una variación de la muestra. Por lo tanto, el nivel medido en una muestra particular se compara con el nivel o el intervalo de niveles determinado en muestras similares procedentes de un sujeto denominado normal. En este contexto, un "sujeto normal" es un individuo sin una enfermedad detectable, por ejemplo, y un paciente o población "normal" (a veces denominados "control") es uno que no muestra una enfermedad detectable, respectivamente, por ejemplo. Además, dado que el analito no se encuentra de forma rutinaria en un nivel alto en la mayoría de las poblaciones humanas, un "sujeto normal" puede ser considerado un individuo con una cantidad o concentración de analito incrementada o elevada que no es sustancialmente detectable, y un paciente o población "normal" (a veces denominados "control") es uno que muestra una cantidad o concentración de analito incrementada o elevada que no es sustancialmente detectable. Un "sujeto aparentemente normal" es uno en el que el analito aún no se ha evaluado o está siendo evaluado. Se dice que el nivel de un analito es "elevado" cuando el analito es indetectable normalmente (por ejemplo, el nivel normal es cero, o dentro de un intervalo de aproximadamente 25 a aproximadamente 75 percentiles de las poblaciones normales), pero se detecta en una muestra de ensayo, así como cuando el analito está presente en la muestra de ensayo a un nivel superior al normal. Por lo tanto, entre otras cosas, la descripción proporciona un método de escrutinio de un sujeto que tiene, o tiene riesgo de tener, una enfermedad, trastorno o afección particular. El método del ensayo también puede implicar el ensayo de otros marcadores y similares.

Por consiguiente, los métodos descritos en este documento también pueden emplearse para determinar si un sujeto tiene una enfermedad, un trastorno o una afección dada, o si tiene riesgo de desarrollarla. En concreto, un método de este tipo puede comprender las etapas de:

(a) determinar la concentración o la cantidad de IL-1 $\beta$  (o un fragmento de la misma) en una muestra de ensayo procedente de un sujeto (por ejemplo, usando los métodos descritos en el presente documento, o métodos conocidos en la técnica); y

(b) comparar la concentración o la cantidad de IL-1 $\beta$  (o un fragmento de la misma) determinada en la etapa (a) con un nivel predeterminado, en donde si la concentración o la cantidad de analito determinada en la etapa (a) es favorable con respecto a un nivel predeterminado, entonces se determina que el sujeto no tiene una enfermedad, un trastorno o una afección dada, o no tiene riesgo de la misma. Sin embargo, si la concentración o la cantidad de IL-1 $\beta$  determinada en la etapa (a) es desfavorable con respecto al nivel predeterminado, entonces se determina que el sujeto tiene una enfermedad, un trastorno o una afección dada, o tiene riesgo de la misma.

Además, se proporciona en este documento un método de seguimiento de la progresión de una enfermedad en un sujeto. De manera óptima el método comprende las etapas de:

(a) determinar la concentración o la cantidad de IL-1 $\beta$  en una muestra de ensayo procedente de un sujeto;

(b) determinar la concentración o la cantidad de IL-1 $\beta$  en una muestra de ensayo posterior procedente del sujeto; y

(c) comparar la concentración o la cantidad de analito tal como se determina en la etapa (b) con la concentración o la cantidad de IL-1 $\beta$  determinada en la etapa (a), en donde si la concentración o la cantidad determinada en la etapa (b) no se ha modificado o es desfavorable cuando se compara con la concentración o la cantidad de IL-1 $\beta$  determinada en la etapa (a), entonces se determina que la enfermedad en el sujeto ha continuado, ha progresado o ha empeorado. En comparación, si la concentración o la cantidad de IL-1 $\beta$  tal y como se ha determinado en la etapa (b) es favorable en comparación con la concentración o la cantidad de IL-1 $\beta$  tal y como se ha determinado en la etapa (a), entonces se determina que la enfermedad en el sujeto no ha continuado, ha revertido o ha mejorado.

Opcionalmente, el método comprende además comparar la concentración o la cantidad de analito IL-1 $\beta$ , tal y como se determina en la etapa (b), por ejemplo, con un nivel predeterminado. Además, opcionalmente, el método comprende tratar al sujeto con una o varias composiciones farmacéuticas durante un período de tiempo, si la comparación muestra que la concentración o la cantidad de analito tal como se determina en la etapa (b), por ejemplo, está alterada de forma desfavorable con respecto al nivel predeterminado.

Aún más, los métodos se pueden utilizar para vigilar el tratamiento en un sujeto que recibe tratamiento con una o varias composiciones farmacéuticas. Específicamente, tales métodos implican proporcionar una primera muestra de ensayo procedente de un sujeto antes de que se administren al sujeto una o varias composiciones farmacéuticas. A continuación, se determina la concentración o la cantidad de IL-1 $\beta$  en una primera muestra de ensayo de un sujeto (por ejemplo, usando los métodos descritos en este documento o conocidos en la técnica). Después de determinar la concentración o la cantidad de IL-1 $\beta$ , opcionalmente, la concentración o la cantidad de IL-1 $\beta$  se compara entonces

con un nivel predeterminado. Si la concentración o la cantidad de IL-1 $\beta$  tal y como se determina en la primera muestra de ensayo es inferior al nivel predeterminado, entonces el sujeto no se trata con una o varias composiciones farmacéuticas. Sin embargo, si la concentración o la cantidad de IL-1 $\beta$  tal y como se determina en la primera muestra de ensayo es mayor que el nivel predeterminado, entonces el sujeto se trata con una o varias composiciones farmacéuticas durante un período de tiempo. El período de tiempo durante el cual se trata al sujeto con una o varias composiciones farmacéuticas, puede estar determinado por un experto en la técnica (por ejemplo, el período de tiempo puede ser desde aproximadamente siete (7) días a aproximadamente dos años, preferiblemente desde aproximadamente catorce (14) días a aproximadamente un (1) año).

Durante el curso del tratamiento con una o varias composiciones farmacéuticas, la segunda muestra de ensayo y las subsiguientes se obtienen entonces a partir del sujeto. El número de muestras de ensayo y el tiempo durante el cual se obtienen dichas muestras de ensayo a partir del sujeto, no son decisivos. Por ejemplo, se puede obtener una segunda muestra de ensayo siete (7) días después de administrar al sujeto por primera vez una o varias composiciones farmacéuticas, se puede obtener una tercera muestra de ensayo dos (2) semanas después de administrar al sujeto por primera vez una o varias composiciones farmacéuticas, se puede obtener una cuarta muestra de ensayo tres (3) semanas después de administrar al sujeto por primera vez una o varias composiciones farmacéuticas, se puede obtener una quinta muestra de ensayo cuatro (4) semanas después de administrar al sujeto por primera vez una o varias composiciones farmacéuticas, etc.

Después de obtener a partir del sujeto cada segunda muestra de ensayo o las posteriores, se determina la concentración o la cantidad de analito IL-1 $\beta$  en la segunda muestra de ensayo o en las posteriores (por ejemplo, usando los métodos descritos en este documento o como se conocen en la técnica). La concentración o la cantidad de IL-1 $\beta$  tal y como se determina en cada una de la segunda muestra de ensayo o las posteriores, a continuación, se compara con la concentración o la cantidad de analito tal y como se determina en la primera muestra de ensayo (por ejemplo, la muestra de ensayo que se comparó originalmente de forma opcional con el nivel predeterminado). Si la concentración o la cantidad de IL-1 $\beta$  tal y como se determina en la etapa (c) es favorable en comparación con la concentración o la cantidad de analito tal como se determina en la etapa (a), entonces se determina que la enfermedad en el sujeto no ha continuado, ha remitido o ha mejorado y se debe continuar administrando al sujeto una o varias composiciones farmacéuticas de la etapa (b). Sin embargo, si la concentración o la cantidad determinada en la etapa (c) no tiene cambios o es desfavorable en comparación con la concentración o la cantidad de analito tal como se ha determinado en la etapa (a), entonces se determina que la enfermedad en el sujeto ha continuado, ha progresado o ha empeorado y el sujeto debe tratarse con una mayor concentración de una o varias composiciones farmacéuticas administradas al sujeto en la etapa (b) o el sujeto debe tratarse con una o varias composiciones farmacéuticas que son diferentes de una o varias composiciones farmacéuticas administradas al sujeto en la etapa (b). Específicamente, el sujeto puede ser tratado con una o varias composiciones farmacéuticas que son diferentes de una o varias composiciones farmacéuticas que el sujeto había recibido previamente para disminuir o reducir dicho nivel de analito en el sujeto.

En general, para ensayos en los que se puede realizar una repetición de la prueba (por ejemplo, el seguimiento de la progresión de la enfermedad y/o la respuesta frente al tratamiento), se obtiene una segunda muestra de ensayo o posteriores durante un período en el tiempo después de obtener la primera muestra de ensayo a partir del sujeto. Específicamente, se puede obtener una segunda muestra de ensayo del sujeto minutos, horas, días, semanas o años después de haber obtenido la primera muestra de ensayo a partir del sujeto. Por ejemplo, la segunda muestra de ensayo se puede obtener a partir del sujeto en un periodo de tiempo de aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, aproximadamente 17 semanas, aproximadamente 18 semanas, aproximadamente 19 semanas, aproximadamente 20 semanas, aproximadamente 21 semanas, aproximadamente 22 semanas, aproximadamente 23 semanas, aproximadamente 24 semanas, aproximadamente 25 semanas, aproximadamente 26 semanas, aproximadamente 27 semanas, aproximadamente 28 semanas, aproximadamente 29 semanas, aproximadamente 30 semanas, aproximadamente 31 semanas, aproximadamente 32 semanas, aproximadamente 33 semanas, aproximadamente 34 semanas, aproximadamente 35 semanas, aproximadamente 36 semanas, aproximadamente 37 semanas, aproximadamente 38 semanas, aproximadamente 39 semanas, aproximadamente 40 semanas, aproximadamente 41 semanas, aproximadamente 42 semanas, aproximadamente 43 semanas, aproximadamente 44 semanas, aproximadamente 45 semanas, aproximadamente 46 semanas, aproximadamente 47 semanas, aproximadamente

48 semanas, aproximadamente 49 semanas, aproximadamente 50 semanas, aproximadamente 51 semanas, aproximadamente 52 semanas, aproximadamente 1,5 años, aproximadamente 2 años, aproximadamente 2,5 años, aproximadamente 3,0 años, aproximadamente 3,5 años, aproximadamente 4,0 años, aproximadamente 4,5 años, aproximadamente 5,0 años, aproximadamente 5,5 años, aproximadamente 6,0 años, aproximadamente 6,5 años, aproximadamente 7,0 años, aproximadamente 7,5 años, aproximadamente 8,0 años, aproximadamente 8,5 años, aproximadamente 9,0 años, aproximadamente 9,5 años o aproximadamente 10,0 años después de obtener la primera muestra de ensayo del sujeto.

Cuando se usa para controlar la progresión de una enfermedad, el ensayo anterior se puede utilizar para controlar la progresión de una enfermedad en sujetos que padecen estados agudos. Los estados agudos, también conocidos como estados de cuidados intensivos, se refieren a enfermedades agudas, que amenazan la vida u otros estados de cuidados intensivos que implican, por ejemplo, el sistema cardiovascular o el sistema excretor. Normalmente, los estados de cuidados intensivos se refieren a los estados que requieren una intervención médica aguda en un entorno hospitalario (incluyendo, pero no limitado a, la sala de emergencias, unidad de cuidados intensivos, centro de traumatología u otro entorno de cuidados de emergencia) o la administración a través de personal sanitario u otro personal médico sobre el terreno. Para los estados de cuidados intensivos, se realiza una vigilancia repetida generalmente dentro de un marco de tiempo más corto, es decir, minutos, horas o días (por ejemplo, aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días o aproximadamente 7 días) y el ensayo inicial se realiza generalmente del mismo modo dentro de un marco de tiempo más corto, por ejemplo, aproximadamente minutos, horas o días desde la aparición de la enfermedad o afección.

Los ensayos también se pueden usar para vigilar la progresión de una enfermedad en sujetos que padecen estados crónicos o no agudos. Los estados que no son de cuidados intensivos o no son agudos, se refieren a estados distintos de una enfermedad aguda, que amenaza la vida u otros estados de cuidados intensivos que implican, por ejemplo, el sistema cardiovascular y/o el sistema excretor. Normalmente, los estados no agudos incluyen los de una duración más larga o crónicos. Para los estados no agudos, el seguimiento repetido se realiza generalmente durante un marco temporal más largo, por ejemplo, horas, días, semanas, meses o años (por ejemplo, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, aproximadamente 17 semanas, aproximadamente 18 semanas, aproximadamente 19 semanas, aproximadamente 20 semanas, aproximadamente 21 semanas, aproximadamente 22 semanas, aproximadamente 23 semanas, aproximadamente 24 semanas, aproximadamente 25 semanas, aproximadamente 26 semanas, aproximadamente 27 semanas, aproximadamente 28 semanas, aproximadamente 29 semanas, aproximadamente 30 semanas, aproximadamente 31 semanas, aproximadamente 32 semanas, aproximadamente 33 semanas, aproximadamente 34 semanas, aproximadamente 35 semanas, aproximadamente 36 semanas, aproximadamente 37 semanas, aproximadamente 38 semanas, aproximadamente 39 semanas, aproximadamente 40 semanas, aproximadamente 41 semanas, aproximadamente 42 semanas, aproximadamente 43 semanas, aproximadamente 44 semanas, aproximadamente 45 semanas, aproximadamente 46 semanas, aproximadamente 47 semanas, aproximadamente 48 semanas, aproximadamente 49 semanas, aproximadamente 50 semanas, aproximadamente 51 semanas, aproximadamente 52 semanas, aproximadamente 1,5 años, aproximadamente 2 años, aproximadamente 2,5 años, aproximadamente 3,0 años, aproximadamente 3,5 años, aproximadamente 4,0 años, aproximadamente 4,5 años, aproximadamente 5,0 años, aproximadamente 5,5 años, aproximadamente 6,0 años, aproximadamente 6,5 años, aproximadamente 7,0 años, aproximadamente 7,5 años, aproximadamente 8,0 años, aproximadamente 8,5 años, aproximadamente 9,0 años, aproximadamente 9,5 años o aproximadamente 10,0 años) y del mismo modo, el ensayo inicial se realiza generalmente durante un período de tiempo más largo, por ejemplo, aproximadamente horas, días, meses o años desde la aparición de la enfermedad o la afección.

Además, los ensayos anteriores se pueden realizar usando una primera muestra de ensayo obtenida a partir de un

sujeto, en donde la primera muestra de ensayo se obtiene a partir de una fuente, tal como orina, suero o plasma. Opcionalmente, los ensayos anteriores se pueden repetir utilizando una segunda muestra de ensayo obtenida a partir del sujeto, en donde la segunda muestra de ensayo se obtiene a partir de otra fuente. Por ejemplo, si la primera muestra de ensayo se ha obtenido a partir de orina, la segunda muestra de ensayo se puede obtener a partir de suero o plasma. Los resultados obtenidos de los ensayos utilizando la primera muestra de ensayo y la segunda muestra de ensayo se pueden comparar. La comparación se puede emplear para evaluar el estado de una enfermedad o afección en el sujeto.

Por otra parte, la presente descripción también se refiere a métodos para determinar si un sujeto que está predispuesto a padecer o que padece una enfermedad, trastorno o afección dada, se beneficiará del tratamiento. En particular, la descripción se refiere a métodos y productos de diagnóstico que acompañan al analito. Por lo tanto, el método de "seguimiento del tratamiento de una enfermedad en un sujeto" tal y como se describe en esta memoria, también puede incluir de forma más óptima, seleccionar o identificar candidatos para una terapia.

Por lo tanto, en realizaciones particulares, la descripción también proporciona un método para determinar si un sujeto que tiene, o tiene riesgo de tener, una enfermedad, trastorno o afección dada es un candidato para una terapia. Generalmente, el sujeto es alguien que ha experimentado algún síntoma de una enfermedad, trastorno o afección dada o al que se ha diagnosticado recientemente que tiene una enfermedad, trastorno o afección dada, y/o que muestra una concentración desfavorable o una cantidad de analito o un fragmento del mismo, como se describe en el presente documento.

El método comprende opcionalmente un ensayo como se describe en este documento, en donde IL-1 $\beta$  se evalúa antes y después del tratamiento de un sujeto con una o varias composiciones farmacéuticas (por ejemplo, en particular con un producto farmacéutico relacionado con un mecanismo de acción que implica un analito), con terapia inmunosupresora, o con terapia de inmunoadsorción, o en donde se evalúa analito después de tal tratamiento y la concentración o la cantidad de analito se compara con un nivel predeterminado. Una concentración desfavorable de cantidad de IL-1 $\beta$ , observada después del tratamiento, confirma que el sujeto no se beneficiará de recibir un tratamiento adicional o continuado, mientras que una concentración o cantidad de analito favorable, observada después del tratamiento, confirma que el sujeto se beneficiará de recibir un tratamiento adicional o continuado. Esta confirmación ayuda a la gestión de estudios clínicos y al otorgar una mejor atención al paciente.

Huelga decir que, si bien ciertas realizaciones en el presente documento son ventajosas cuando se emplean para evaluar una enfermedad, trastorno o afección dada tal y como se describe en esta memoria, los ensayos y los kits se pueden emplear para evaluar un analito en otras enfermedades, trastornos y afecciones. El método de ensayo también puede implicar el ensayo de otros marcadores y similares.

El método de ensayo también se puede emplear para identificar un compuesto que mejora una enfermedad, trastorno o afección dada. Por ejemplo, una célula que expresa un analito se puede poner en contacto con un compuesto candidato. El nivel de expresión de analito en la célula puesta en contacto con el compuesto, se puede comparar con el de una célula de control utilizando el método de ensayo descrito en el presente documento.

## II. Kits

También se proporciona un kit para analizar una muestra de ensayo para estudiar la presencia, la cantidad o la concentración de un analito (o un fragmento del mismo) en una muestra de ensayo. El kit comprende al menos un componente para analizar la muestra de ensayo en relación con IL-1 $\beta$  (o un fragmento de la misma) y las instrucciones para el análisis de la muestra de ensayo para el analito (o un fragmento del mismo). El al menos un componente para analizar la muestra de ensayo para el analito (o un fragmento del mismo) puede incluir una composición que comprende una proteína de unión anti-IL-1 $\beta$ , tal como un anticuerpo monoclonal o DVD-Ig (o un fragmento, una variante o un fragmento de una variante de la misma), como se describe en el presente documento y que se inmoviliza opcionalmente sobre una fase sólida.

El kit puede comprender al menos un componente para analizar la muestra de ensayo en relación con un analito IL-1 $\beta$  mediante inmunoensayo, por ejemplo, inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscente, y las instrucciones para analizar la muestra de ensayo en relación con un analito IL-1 $\beta$  mediante inmunoensayo, por ejemplo, inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscente. Por ejemplo, el kit puede comprender al menos un ligando específico para IL-1 $\beta$ , tal como un anticuerpo anti-IL-1 $\beta$  monoclonal/policlonal (o un fragmento del mismo que puede unirse al analito IL-1 $\beta$ , una variante del mismo que puede unirse al analito o un fragmento de una variante que se puede unir al analito) o una DVD-Ig anti-IL-1 $\beta$  (o un fragmento, una variante o un fragmento de una variante de la misma), cualquiera de los cuales puede estar marcado de forma detectable. Alternativa o adicionalmente, el kit puede comprender un analito IL-1 $\beta$  marcado de forma detectable (o un fragmento del mismo que puede unirse a un anticuerpo anti-analito, monoclonal/policlonal o una DVD-Ig anti-analito (o un fragmento, una variante o un fragmento de una variante de la misma)), que puede competir con cualquier analito en una muestra de ensayo por la unión a un anticuerpo anti-analito monoclonal/policlonal (o un fragmento del mismo que puede unirse al analito, una variante del mismo que puede unirse al analito o un fragmento de una variante que se puede unir al analito) o una DVD-Ig anti-analito (o un fragmento, una variante o un fragmento de una variante de la misma), cualquiera de los cuales puede estar inmovilizado sobre un soporte sólido. El kit puede comprender un calibrador o un control, por ejemplo, un

analito aislado o purificado. El kit puede comprender al menos un recipiente (por ejemplo, un tubo, placas de microtitulación o tiras, que pueden estar ya recubiertas con un primer ligando específico, por ejemplo) para la realización del ensayo, y/o un tampón, tal como un tampón de ensayo o un tampón de lavado, uno de los cuales se puede proporcionar como una solución concentrada, una solución de sustrato para el marcador detectable (por ejemplo, un marcador enzimático) o una solución de parada. Preferiblemente, el kit comprende todos los componentes, es decir, reactivos, patrones, tampones, diluyentes, etc., que son necesarios para realizar el ensayo. Las instrucciones pueden estar en formato de papel o de forma legible por ordenador, tal como un disco, CD, DVD o similares.

Cualquier proteína de unión, tal como una proteína de unión anti-IL-1 $\beta$  o una DVD-Ig anti-analito, o un trazador puede incorporar un marcador detectable tal como se describe en el presente documento, tal como un fluoróforo, un resto radioactivo, una enzima, un marcador de biotina/avidina, un cromóforo, un marcador quimioluminiscente o similar, o el kit puede incluir reactivos para llevar a cabo un marcado detectable. Los anticuerpos, calibradores y/o controles pueden proporcionarse en recipientes separados o dosificar previamente en un formato de ensayo apropiado, por ejemplo, en placas de microtitulación.

Opcionalmente, el kit incluye componentes de control de calidad (por ejemplo, paneles de sensibilidad, calibradores y controles positivos). La preparación de reactivos de control de calidad es bien conocida en la técnica y se describe en hojas anexas para una variedad de productos de inmunodiagnóstico. Los miembros del panel de sensibilidad se utilizan opcionalmente para establecer características del rendimiento del ensayo y además opcionalmente son indicadores útiles de la integridad de los reactivos del kit del inmunoensayo y de la estandarización de ensayos.

El kit también puede incluir opcionalmente otros reactivos necesarios para llevar a cabo un ensayo de diagnóstico o para facilitar evaluaciones de control de calidad, tales como tampones, sales, enzimas, cofactores enzimáticos, sustratos de enzimas, reactivos de detección y similares. Otros componentes, tales como tampones y soluciones para el aislamiento y/o el tratamiento de una muestra de ensayo (por ejemplo, reactivos de pretratamiento), también pueden incluirse en el kit. El kit puede incluir adicionalmente uno o varios de otros controles. Uno o varios de los componentes del kit se pueden liofilizar, en cuyo caso el kit puede comprender además reactivos adecuados para la reconstitución de los componentes liofilizados.

Los diversos componentes del kit se proporcionan enzimas en recipientes adecuados, según sea necesario, por ejemplo, una placa de microtitulación. El kit puede incluir además recipientes para sostener o almacenar una muestra (por ejemplo, un recipiente o un cartucho para una muestra de orina). En su caso, el kit también puede contener opcionalmente recipientes de reacción, recipientes de mezcla y otros componentes que facilitan la preparación de reactivos o la muestra de ensayo. El kit también puede incluir uno o varios instrumentos para ayudar en la obtención de una muestra de ensayo, tal como una jeringa, pipeta, fórceps, cuchara de medición o similares.

Si el marcador detectable es al menos un compuesto de acridinio, el kit puede comprender al menos una acridinio-9-carboxamida, al menos un éster de arilo de acridinio-9-carboxilato, o cualquier combinación de los mismos. Si el marcador detectable es al menos un compuesto de acridinio, el kit también puede comprender una fuente de peróxido de hidrógeno, tal como un tampón, una solución y/o al menos una solución básica. Si se desea, el kit puede contener una fase sólida, tal como una partícula magnética, perla, tubo de ensayo, placa de microtitulación, cubeta, membrana, molécula de soporte, película, papel de filtro, disco o chip.

### III. Adaptación del kit y método

El kit (o componentes del mismo), así como el método para determinar la presencia, cantidad o concentración de un analito en una muestra de ensayo mediante un ensayo, tal como un inmunoensayo, como se describe en el presente documento, se pueden adaptar para emplear en una variedad de sistemas automatizados y semiautomatizados (incluyendo aquellos en los que la fase sólida comprende una micropartícula), como se describe, por ejemplo, en los documentos de Patente de EE.UU. n° 5.089.424 y 5.006.309 y como se comercializa, por ejemplo, en Abbott Laboratories (Abbott Park, Illinois) como ARCHITECT®.

Algunas de las diferencias entre un sistema automatizado o semiautomatizado, en comparación con un sistema no automatizado (por ejemplo, ELISA), incluyen el sustrato al que se fija el primer ligando específico (por ejemplo, un anticuerpo anti-analito, monoclonal/policonal (o un fragmento del mismo, una variante del mismo o un fragmento de una variante del mismo) o una DVD-Ig anti-analito (o un fragmento de la misma, una variante de la misma o un fragmento de una variante de la misma); en ambos casos, la formación del sándwich y la reactividad del analito pueden estar impactadas) y la longitud y el momento de la captura, la detección y/o cualquier etapa de lavado opcional. Considerando que un formato no automatizado, tal como un ELISA, puede requerir un tiempo de incubación relativamente más largo con la muestra y el reactivo de captura (por ejemplo, aproximadamente 2 horas), un formato automatizado o semiautomatizado (por ejemplo, ARCHITECT®, Abbott Laboratories) puede tener un tiempo de incubación relativamente corto (por ejemplo, aproximadamente 18 minutos para ARCHITECT®). Del mismo modo, mientras que en un formato no automatizado, tal como un ELISA, se puede incubar un anticuerpo de detección, tal como el reactivo conjugado, durante un tiempo de incubación relativamente más largo (por ejemplo, aproximadamente 2 horas), un formato automatizado o semiautomatizado (por ejemplo, ARCHITECT®) puede tener un tiempo de incubación relativamente corto (por ejemplo, aproximadamente 4 minutos para ARCHITECT®).



Otras plataformas disponibles en Abbott Laboratories incluyen, pero no se limitan a, AxSYM<sup>®</sup>, IMx<sup>®</sup> (véase, por ejemplo, el documento de Patente de EE.UU. n.º 5.294.404), PRISM<sup>®</sup>, EIA (perla) y Quantum<sup>®</sup> II, así como otras plataformas. Además, los ensayos, los kits y los componentes de kits pueden emplearse en otros formatos, por ejemplo, en sistemas de ensayo electroquímicos, u otros sistemas manuales o inmediatos. La presente descripción, por ejemplo, es aplicable al sistema de inmunoensayo electroquímico comercial Abbott Point of Care (i-STAT<sup>®</sup>, Abbott Laboratories) que realiza inmunoensayos de tipo sándwich. Inmunosensores y sus métodos de fabricación y funcionamiento en dispositivos de prueba de un solo uso, se describen, por ejemplo en los documentos de Patente de EE.UU. n.º 5.063.081, Publicación de EE.UU. n.º 2003/0170881, Publicación de EE.UU. n.º 2004/0018577, Publicación de EE.UU. n.º 2005/0054078 y Publicación de EE.UU. n.º 2006/0160164.

En particular, con respecto a la adaptación de un ensayo de analito en el sistema I-STAT<sup>®</sup>, se prefiere la siguiente configuración. Un chip de silicio microfabricado se prepara con una pareja de electrodos de trabajo, amperométricos de oro y un electrodo de referencia de plata-cloruro de plata. En uno de los electrodos de trabajo, perlas de poliestireno (0,2 mm de diámetro) con anticuerpo anti-analito, monoclonal/policlonal inmovilizado (o un fragmento del mismo, una variante del mismo o un fragmento de una variante del mismo) o una DVD-Ig anti-analito (o un fragmento de la misma, una variante de la misma o un fragmento de una variante de la misma), se adhieren a un recubrimiento polimérico de poli(alcohol vinílico) estampado sobre el electrodo. Este chip se monta sobre un cartucho I-STAT<sup>®</sup> con un formato de fluido adecuado para inmunoensayo. Sobre una porción de la pared de la cámara de sujeción de la muestra del cartucho, hay una capa que comprende un ligando específico para un analito, tal como un anticuerpo anti-analito, monoclonal/policlonal (o un fragmento del mismo, una variante del mismo o un fragmento de una variante del mismo que se puede unir el analito) o una DVD-Ig anti-analito (o un fragmento de la misma, una variante de la misma o un fragmento de una variante de la misma que se puede unir el analito), cualquiera de los cuales puede estar marcado de forma detectable. Dentro de la bolsa de fluido del cartucho hay un reactivo acuoso que incluye fosfato de p-aminofenol.

En funcionamiento, una muestra sospechosa de contener un analito, se añade a la cámara de sujeción del cartucho de ensayo y el cartucho se inserta en el lector de I-STAT<sup>®</sup>. Después de que el ligando específico para un analito se ha disuelto en la muestra, un elemento de bomba dentro del cartucho fuerza a la muestra dentro de un conducto que contiene el chip. Aquí se hace oscilar para favorecer la formación del sándwich. En la penúltima etapa del ensayo, el líquido es forzado a salir de la bolsa y entrar en el conducto para sacar la muestra fuera del chip por lavado y entrar en una cámara de residuos. En la etapa final del ensayo, el marcador de fosfatasa alcalina reacciona con fosfato de p-aminofenol para escindir el grupo fosfato y permitir que el p-aminofenol liberado se oxide electroquímicamente en el electrodo de trabajo. Basándose en la corriente medida, el lector es capaz de calcular la cantidad de analito en la muestra por medio de un algoritmo incrustado y la curva de calibración determinada en fábrica.

Es evidente que los métodos y kits tal y como se describen en esta memoria incluyen necesariamente otros reactivos y métodos para llevar a cabo el inmunoensayo. Por ejemplo, se incluyen diversos tampones tales como los conocidos en la técnica y/o que se pueden preparar fácilmente u optimizar para ser empleados, por ejemplo, para el lavado, como un diluyente de conjugado, un diluyente de micropartículas y/o como un diluyente de calibrador. Un diluyente de conjugado ejemplar es el diluyente de conjugado ARCHITECT<sup>®</sup> empleado en ciertos kits (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois) y que contiene ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), una sal, un bloqueador de proteínas, un agente antimicrobiano y un detergente. Un diluyente de calibrador ejemplar es el diluyente de calibrador humano ARCHITECT<sup>®</sup> empleado en ciertos kits (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois), que comprende un tampón que contiene MES, otra sal, un bloqueador de proteínas y un agente antimicrobiano. Además, como se describe en el documento de EE.UU. con n.º de serie 12/650.241 (publicación de EE.UU. n.º 2010/0167301; véase, también la publicación PCT n.º WO 2010/078443), se puede obtener una mejora de la generación de señal, por ejemplo, en un formato de cartucho I-Stat, utilizando una secuencia de ácido nucleico ligada al anticuerpo señal como un amplificador de la señal.

Será claramente evidente para los expertos en la técnica que otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de los métodos de la invención descritos en este documento, son obvias y se pueden realizar utilizando equivalentes adecuados sin apartarse del alcance de la invención o las realizaciones descritas en el presente documento.

Habiendo descrito ahora la presente invención en detalle, la misma se entenderá más claramente haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen para fines de ilustración solamente y no se pretende que sean limitativos de la invención.

### **Ejemplificaciones**

#### **Ejemplo 1: Generación de anticuerpos de IL-1 $\beta$ humanizados madurados por afinidad a partir del clon E26**

La Tabla 6 proporciona las secuencias de aminoácidos de la VH y VL del anticuerpo E26 de ratón humanizado (GlaxoSmithKline, documento de publicación PCT n.º WO 95/01997). Los residuos de aminoácidos de las CDRs individuales de cada secuencia de VH y VL se indican en negrita.

**Tabla 6. Secuencias de aminoácidos de regiones VH y VL del anticuerpo E26 humanizado**

SEQ ID NO:	Región proteica		Secuencia
			123456789012345678901234567890
58	VH E26		EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS <b>SYDMS</b> WVRQAPGKGLEWVA <b>YISSGGGGTY</b> <b>PDTVKGRFTT</b> SRDNSKNTLFLQMDSLRPED TGVYFCAR <b>GGVTKGYFDV</b> WGQGTPVTVSS
	VH E26 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ-ID NO:58	<b>SYDMS</b>
	VH E26 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ-ID NO:58	<b>YISSGGGGTYYPDTVKG</b>
	VH E26 CDR-H3	Residuos 99-108 de SEQ-ID NO:58	<b>GGVTKGYFDV</b>
59	VL E26		DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTC <b>RASGNIH</b> <b>NYLT</b> WYQQTPGKAPKLLI <b>YNAKTLAD</b> GVPS RFGSGSGTDYFTTISLQPEDIAITYY <b>Q</b> <b>QH</b> <b>FWSIPYTF</b> GQGTKLQIT
	VL E26 CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ-ID NO:59	<b>RASGNIHNYLT</b>
	VL E26 CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ-ID NO:59	<b>NAKTLAD</b>
	VL E26 CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ-ID NO:59	<b>QHFWSIPYT</b>

Los anticuerpos E26 de ratón humanizados, madurados por afinidad se obtuvieron del modo siguiente. Un banco de cadenas ligeras se construyó para contener una mutagénesis limitada en los siguientes residuos: CDRL1: 30, 31, 32; CDRL2: 50, 53, 55, 56; CDRL3: 92, 93, 94, 96 y 97 (numeración de Kabat). Se prepararon dos bancos de cadena pesada para contener una mutagénesis limitada en CDRH1 y CDRH2 en los residuos 31, 33, 50, 52a, 55, 56, 57, 58 y 60 (numeración de Kabat) o en CDRH3 en los residuos 95, 96, 97, 98, 99, 100, 100a, 100b y 102. Los bancos de cadenas pesadas también contenían diversidades binarias en los residuos 23(A/S), 24(A/S), 62(T/S), 84(P/A), 88(G/A), 91(F/Y) y 108(P/L) para permitir regiones estructurales de la línea germinal durante las selecciones del banco. Los tres bancos se seleccionaron por separado mediante concentraciones decrecientes de IL-1 $\beta$  de mono cynomolgus (cyno). Todas las secuencias de CDRs mutadas se combinaron después en un banco que tenía mutaciones solo en las CDRs de VH y otro banco que tenía mutaciones en las seis CDRs. Estos dos bancos combinados se sometieron a condiciones de selección más estrictas con IL-1 $\beta$  humana y cyno antes de identificar los anticuerpos individuales y expresarlos como proteínas de IgG para una caracterización adicional.

La Tabla 7 proporciona una lista de secuencias de aminoácidos de la región VH de los anticuerpos de IL-1 $\beta$  madurados por afinidad obtenidos a partir de E26 humanizado. Los residuos de aminoácidos de las CDRs individuales de cada secuencia de VH se indican en negrita.

**Tabla 7. Secuencias de aminoácidos de variantes de VH de E26 maduradas por afinidad**

Clon	SEQ ID NO:	Secuencia
		1234567890123456789012345678901234567890
E26 n°1	60	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSK <b>YDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YI SHGGAGTYYPDSVKGRFTT</b> SRDNSKNTLFLQMDSLRAEDTGVYYCAR <b>GGVYKGYFDE</b> WGQGTPVTVSS
E26 n°11	61	

ES 2 635 594 T3

Clon	SEQ ID NO:	Secuencia
		1234567890123456789012345678901234567890
		EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWV <b>AYISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTAVYYC <b>ARGGVYKGYFDV</b> WGQ <b>GTPTVSS</b>
E26 n°35	62	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWV <b>AYISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRAEDTAVYYC <b>ARGGVYKGYFDV</b> WGQ <b>GTPTVSS</b>
E26 n° 37	63	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSKYDMS</b> WVRQA PGKGLEWV <b>AYISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTGVYYC <b>ARGGVYKGYFDV</b> WGQ <b>GTPTVSS</b>
J318 n°2	64	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFI <b>FSKYDMS</b> WVRQA PGKGLEWV <b>AYISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTGVYFC <b>ARGGVTKGYFDV</b> WGQ <b>GTPTVSS</b>
J318 n°12	65	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWV <b>AYISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTGVYFC <b>ARGGVTKGYFDV</b> WGQ <b>GTPTVSS</b>
J318 n°13	66	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWV <b>AYISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTGVYFC <b>ARGGVTKGYFDV</b> WGQ <b>GTPTVSS</b>
J348S2-10	67	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSKYDMS</b> WVRQA PGKGLEWV <b>AYISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTAVYYC <b>ARGGVYKGYFDEW</b> GQ <b>GTPTVSS</b>
J348S2-85	68	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSKYDMS</b> WVRQA PGKGLEWV <b>AYISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRAEDTAVYYC <b>ARGGVYKGYFDV</b> WGQ <b>GTPTVSS</b>
J348S2-1	69	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSKYDMS</b> WVRQA PGKGLEWV <b>AYISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRAEDTGVYYC <b>ARGGVYKGYFDEW</b> GQ <b>GTPTVSS</b>
J348S2-37	70	

ES 2 635 594 T3

Clon	SEQ ID NO:	Secuencia
		1234567890123456789012345678901234567890
		EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSKYDMS</b> WVRQA PGKGLEWV <b>YISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTGVYYCAR <b>GGVYKGYFDV</b> WGQ <b>GTPTVSS</b>
J348S2-49	71	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWV <b>YISHGGAGTYYPDTVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRAEDTGVYYCAR <b>GGVYKGYFDEW</b> GQ <b>GTPTVSS</b>
J348S2-56	72	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWV <b>YISHGGAGTYYPDTVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTGVYYCAR <b>GGVYKGYFDEW</b> GQ <b>GTPTVSS</b>
J348S2-25	73	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWV <b>YISHGGAGTYYPDTVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTGVYYCAR <b>GGVYKGYFDV</b> WGQ <b>GTPTVSS</b>
J348S2-45	74	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWV <b>YISHGGAGTYYPDTVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRAEDTGVYYCAR <b>GGVYKGYFDV</b> WGQ <b>GTPTVSS</b>
J348S2-94	75	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWV <b>YISHGGAGTYYPDTVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRAEDTAVYYCAR <b>GGVYKGYFDV</b> WGQ <b>GTPTVSS</b>
J348S2-34	76	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWV <b>YISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRVEDTAVYYCAR <b>GGVYKGYFDV</b> WGQ <b>GTPTVSS</b>
J348S2-58	77	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWV <b>YISHGGAGTYYPDTVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTAVYYCAR <b>GGVYKGYFDV</b> WGQ <b>GTPTVSS</b>
J348S2-61	78	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWV <b>YISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRAEDTAVYYCAR <b>GGVYKGYFDLW</b> GQ <b>GTPTVSS</b>
J348S2-80	79	

ES 2 635 594 T3

Clon	SEQ ID NO:	Secuencia
		1234567890123456789012345678901234567890
		EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRAEDTAVYFCAR <b>GGVYKGYFDL</b> WGQ <b>GP</b> TVTVSS
J348S2-96	80	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTAVYFCAR <b>GGVYKGYFDV</b> WGQ <b>GP</b> TVTVSS
J348S2-90	81	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTVSRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTAVYYCAR <b>GGVYKGYFDE</b> WGQ <b>GP</b> TVTVSS
J348S2-21	82	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRAEDTAVYYCAR <b>GGVYKGYFDE</b> WGQ <b>GP</b> TVTVSS
J348S2-39	83	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRAEDTGVYYCAR <b>GGVYKGYFDE</b> WGQ <b>GP</b> TVTVSS
J348S2-53	84	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTGVYFCAR <b>GGVYKGYFDE</b> WGQ <b>GP</b> TVTVSS
J348S2-74	85	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFI <b>FSKYDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRAEDTAVYFCAR <b>GGVYKGYFDE</b> WGQ <b>GP</b> TVTVSS
J348S2-30	86	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTAVYYCAR <b>GGVYKGYFDE</b> WGQ <b>GP</b> TVTVSS
J348S2-73	87	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFI <b>FSKYDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTAVYYCAR <b>GGVYKGYFDM</b> WGQ <b>GP</b> TVTVSS
J348S2-12	88	

ES 2 635 594 T3

Clon	SEQ ID NO:	Secuencia
		1234567890123456789012345678901234567890
		EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFSR <b>YDMS</b> WVRQA PGKGLEWVAYI <b>SHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTAVYYCAR <b>GGVYKGYFDEW</b> QGTLTVSS
J348S2-92	89	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCASSGFIFSR <b>YDMS</b> WVRQA PGKGLEWVAYI <b>SHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTAVYYCAR <b>GGVYKGYFDEW</b> QGTLTVSS
J348S2-14	90	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSR <b>YDMS</b> WVRQA PGKGLEWVAYI <b>SHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTAVYYCAR <b>GGVYKGYFDEW</b> QGTLTVSS
J348S2-33	91	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSR <b>YDMS</b> WVRQA PGKGLEWVAYI <b>SHGGAGTYYPDTVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTAVYYCAR <b>GGVYKGYFDEW</b> QGTLTVSS
J348S2-2	92	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFSR <b>YDMS</b> WVRQA PGKGLEWVAYI <b>SHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTAVYYCVR <b>GGVYKGYFDQ</b> WGQTLTVSS
J348S2-65	93	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSR <b>YDMS</b> WVRQA PGKGLEWVAYI <b>SHGGAGTYYPDTVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTAVYYCVR <b>GGVYKGYFDQ</b> WGQTLTVSS
J348S2-20	94	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFSR <b>YDMS</b> WVRQA PGKGLEWVAYI <b>SHGGAGTYYPDTVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTAVYYCAR <b>GGVYKGYFDEW</b> QGTLTVSS
J348S2-54	95	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFSK <b>YDMS</b> WVRQA PGKGLEWVAYI <b>SHGGAGTYYPDTVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTAVYYCAR <b>GGVYKGYFDEW</b> QGTLTVGS
J348S2-13	96	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFSK <b>YDMS</b> WVRQA PGKGLEWVAYI <b>SHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTAVYYCAR <b>GGVYKGYFDEW</b> QGTLTVSS
J348S2-17	97	

ES 2 635 594 T3

Clon	SEQ ID NO:	Secuencia
		1234567890123456789012345678901234567890
		EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSASGFIFSKYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDTVKGRFTISRDN SKNTLF LQMDSLRPEDTGVYYCARGGVYKGYFDEWGQGLTVSS
J348S2-44	98	EVQLVEGGDVVQPGRSLRLSCSASGFIFSKYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDTVKGRFTISRDN SKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCARGGVYKGYFDEWGQGLTVSS
J348S2-47	99	EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSASGFIFSKYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDTVKGRFTISRDN SKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCARGGVYKGYFDEWGQGLTVSS
J348S2-48	100	EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSASGFIFSKYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCARGGVYKGYFDEWGQGLTVSS
J348S2-22	101	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSKYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDTVKGRFTISRDN SKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCARGGVYKGYFDEWGQGLTVSS
J348S2-42	102	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSKYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCARGGVYKGYFDEWGQGLTVSS
J348S2-84	381	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSKYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCARGGVYKGYFDEWGQGPVTVSS
gi10	103	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSKYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDTVKGRFTISRDN SKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCARGGVYKGYFDEWGQGPVTVSS
gi15	104	EVQLVESGGGVVQPGRGLRLSCSASGFIFSRYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDTVKGRFTISRDN SRNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCARGGVYKGYFDYWGQGPVTVSS
gi68	105	

ES 2 635 594 T3

Clon	SEQ ID NO:	Secuencia
		1234567890123456789012345678901234567890
		EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YVSHGGAGTYYPDTVKGRFT</b> ISRDN <b>SKNTLF</b> LQMSLRAEDTAVYYCAR <b>GGVYKGYFDY</b> WGQ <b>GTPTVSS</b>
gi80	106	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYPDTVKGRFT</b> ISRDN <b>SKNTLF</b> LQMSLRAEDTAVYYCAR <b>GGVYKGYFDY</b> WGQ <b>GTPTVSS</b>
gi5	107	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYPDTVKGRFT</b> ISRDN <b>SKNTLF</b> LQMSLRAEDTAVYYCAR <b>GGVYKGYFDEW</b> WGQ <b>GTPTVSS</b>
gi49	108	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYPDTVKGRFT</b> ISRDN <b>SKNTLF</b> LQMSLRAEDTAVYYCAR <b>GGVYKGYFDV</b> WGQ <b>GTPTVSS</b>
gi78	109	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLGCSASGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYPDTVKGRFT</b> ISRDN <b>SKNTLF</b> LQMSLRAEDTAVYYCAR <b>GGVYKGYFDV</b> WGQ <b>GTPTVSS</b>
gi4	110	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYPDTVKGRFT</b> ISRDN <b>SKNTLF</b> LQMSLRAEDTGVYYCAR <b>GGVYKGYFDV</b> WGQ <b>GTPTVSS</b>
gi66	111	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYPDTVKGRFT</b> ISRDN <b>SKNTLF</b> LQMNSLRAEDTGVYYCAR <b>GGVYKGYFDV</b> WGQ <b>GTPTVSS</b>
gi77	112	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYPDTVKGRFT</b> ISRDN <b>SKNTLF</b> LQMSLRAEDTGVYYCAR <b>GGVYKGYFDV</b> WGQ <b>GTPTVSS</b>
gi19	113	EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSKYDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYPDTAKGRFT</b> ISRDN <b>SKNTLF</b> LQMSLRAEDTGVYYCAR <b>GGVYKGYFDV</b> WGQ <b>GTPTVSS</b>
gi33	114	



ES 2 635 594 T3

Clon	SEQ ID NO:	Secuencia
		1234567890123456789012345678901234567890
		EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSKYGMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYP</b> DTVKGRFTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRAEDTGVYYCAR <b>GGVYKGYFDV</b> WGQ <b>GP</b> PTV <b>VSS</b>
gi58	115	EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSAGGFIF <b>SKYDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYP</b> DTVKGRFTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRAEDTGVYYCAR <b>GGVYKGYFDV</b> WGQ <b>GP</b> PTV <b>VSS</b>
gi79	116	EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSKYDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYP</b> DTVKGRFTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRAEDTGVYYCAR <b>GGVYKGYFDV</b> WGQ <b>GP</b> PTV <b>VSS</b>
gi37	117	EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSKYDMG</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYP</b> DTVKGRFTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRAEDTGVYYCAR <b>GGVYKGYFDV</b> WGQ <b>GP</b> PTV <b>VSS</b>
gi9	118	EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSKYDMS</b> WV <b>HQA</b> PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYP</b> DTVKGRFTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRAEDTAVYYCAR <b>GGVYKGYFDV</b> WGQ <b>GP</b> PTV <b>VSS</b>
gi1	119	EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSKYDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYP</b> DTVKGRFTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTAVYYCAR <b>GGVYKGYFDV</b> WGQ <b>GP</b> PTV <b>VSS</b>
gi2	120	EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSKYDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYP</b> DTVKGRFTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTGVYYCAR <b>GGVYKGYFDV</b> WGQ <b>GP</b> PTV <b>VSS</b>
gi38	121	EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSKYDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYP</b> DTVKGRFTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTGVYFCAR <b>GGVYKGYFDQ</b> WGQ <b>GP</b> PTV <b>VSS</b>
gi74	122	EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSKYDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYP</b> DTVKGRFTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTAVYFCAR <b>GGVYKGYFDV</b> WGQ <b>GP</b> PTV <b>VSS</b>
gi27	123	

ES 2 635 594 T3

Clon	SEQ ID NO:	Secuencia
		1234567890123456789012345678901234567890
		EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFSSYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISSGGGGTYYPDTVKGRFTISRDN SKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCARGGVTKGYFDVWGQGTPTVSS
gi64	124	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFSKYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDTVKGRFTISRDN SKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCARGGVYKGYFDVWGQGTPTVSS
gi85	125	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFSKYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDTVKGRFTISRDN SKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCARGGVYKGYFDVWGQGTPTVSL
gi46	126	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFSKYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCVRGGVYKGYFDVWGQGTPTVSS
gi35	127	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSRYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCARGGVYKGYFDVWGQGTPTVSS
gi45	128	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSRYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLF LQMDSPRAEDTGVYYCARGGVYKGYFDVWGQGTPTVSS
gi90	129	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSRYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLF LQMDSLRAEDTGVYYCARGGVYKGYFDVWGQGTPTVSS
gi11	130	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSRYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCARGGVYKGYFDVWGQGTPTVSS
gi21	131	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSRYDMSRVRLA PGKGLEWVAYISHGGAGTYHPDSVKGRFTISRDN SKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCARGGVYKGYFDVWGQGTPTVSS
gi59	132	

ES 2 635 594 T3

Clon	SEQ ID NO:	Secuencia
		1234567890123456789012345678901234567890
		EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSKYDMS</b> WVRQA PGKGLEWV <b>AYISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTAVYYC <b>ARGGVYKGYFDEW</b> QGTLVTVSS
gi91	133	EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSKYDMS</b> WVRQA PGKGLEWV <b>AYIGHGGAGTYYPDTVKGR</b> FTISR <b>NN</b> SKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYC <b>ARGGVYKGYFDEW</b> QGTLVTVSS
gi60	134	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWV <b>AYISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTAVYYC <b>ARGGVYKGYFDEW</b> QGTLVTVSS
gi36	135	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWV <b>AYISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTAVYYC <b>ARGGVYKGYFDLW</b> QGTPVTVSS
gi12	136	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCASSGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWV <b>AYISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRAEDTGVYYC <b>ARGGVYKGYFDVW</b> QGTPVTVSS
gi55	137	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCASSGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWV <b>AYISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTGVYYC <b>ARGGVYKGYFDVW</b> QGTPVTVSS
gi13	138	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWV <b>AYISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTGVYYC <b>ARGGVYKGYFDVW</b> QGTPVTVSS
gi17	139	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGK <b>PEW</b> V <b>AYISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTGVYYC <b>ARGGVYKGYFDEW</b> QGTPVTVSS
gi16	140	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFI <b>FSRYDMS</b> WVRQA PGKGLEWV <b>AYISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTAVYYC <b>ARGGVYKGF</b> DVWQGTPVTVSS
gi39	141	

Clon	SEQ ID NO:	Secuencia
		1234567890123456789012345678901234567890
		EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFSR <b>YDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTAVYYCAR <b>GGVYKGYFDVWGQ</b> GTPVTVSS
gi24	142	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSR <b>YDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRAEDTGVYFCAR <b>GGVYKGYFDEW</b> GQGTPVTVSS
gi67	143	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSR <b>YDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYPDTVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTGVYFCAR <b>GGVYKGYFDEW</b> GQGTPVTVSS
gi65	144	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSR <b>YDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTGVYFCAR <b>GGVYKGYFDVWGQ</b> GTPVTVSS
gi25	145	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSR <b>YDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYPDTVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTGVYYCAR <b>GGVYKGYFDVWGQ</b> GTPVTVSS
gi20	146	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSR <b>KYDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTGVYYCAR <b>GGVYKGYFDVWGQ</b> GTPVTVSS
gi72	147	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSR <b>YDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTGVYYCAR <b>GGVYKGYFDVWGQ</b> GTLVTVSS
gi84	148	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSR <b>YDMS</b> WVRQA PGKGLEWVA <b>YISHGGAGTYYPDSVKGR</b> FTISRDN <b>SKNTLF</b> LQMDSLRPEDTGVYYCAR <b>GGVYKGYFDVWGQ</b> GTPVTVSS

5 La Tabla 8 proporciona una lista de secuencias de aminoácidos de regiones VL de anticuerpos de IL-1 $\beta$  humanizados madurados por afinidad, obtenidos a partir de E26. Los residuos de aminoácidos de las CDRs individuales de cada secuencia de VL se indican en negrita. La mutación de D (Asp) a G (Gly) N-terminal, observada en algunas de las secuencias de VL maduras por afinidad en la Tabla 8 a continuación, era más probablemente el resultado de una mutagénesis no deseada que se había producido durante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) llevada a cabo durante la construcción del banco. El residuo G N-terminal se podía eliminar sin consecuencias cuando se utilizaban estas regiones en la construcción de moléculas de IgG.

**Tabla 8. Secuencias de aminoácidos de variantes de VL de E26 maduras por afinidad**

ES 2 635 594 T3

Clon	SEQ ID NO:	Secuencia
		1234567890123456789012345678901234567890
E26 nº1	149	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <b>RASGNIYGWLA</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>QAKTLM</b> DGVPSRFSGSGSGTDYFTFISSLQP EDIATYYC <b>QHFWNIPAT</b> FGQGTKLQIT
E26 nº37	150	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <b>RASGNIYTYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKTLAD</b> GVPSRFSGSGSGTDYFTFISSLQP EDIATYYC <b>QHFWTLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-10	151	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <b>RASGNIYQYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKTLAE</b> GVPSRFSGSSSGTDYFTFISSLQP EDIATYYC <b>QHFWKLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-84	152	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <b>RASGNIYQYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKTLAE</b> GVPSRFSGSSSGTDYFTFISSLQP EDIATYYC <b>QHFWKLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-2	153	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <b>RASGNIYEYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKTLAE</b> GVPSRFSGSSSGTDYFTFISSLQP EDIATYYC <b>QHFWKLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-73	154	GIQMAQSPSSLSASVGDRVTITC <b>RASGNIYEYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKTLAE</b> GVPSRFSGSSSGTDYFTFISSLQP EDIATYYC <b>QHFWKLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-13	155	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <b>RASGNIYTYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKTLAE</b> GVPSRFSGSSSGTDYFTFISSLQP EDIATYYC <b>QHFWSLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-18	156	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <b>RASGNIYHYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>DAKTLAE</b> GVPSRFSGSSSGTDYFTFISSLQP EDIATYYC <b>QHFWSLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-24	157	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <b>RASGNIYHYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKTLAE</b> GVPSRFSGSSSGTDYFTFISSLQP EDIATYYC <b>QHFWSLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-22	158	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <b>RASGNIYHYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKTLAE</b> GVPSRFSGSCSGTDYFTFISSLQP EDIATYYC <b>QHFWSLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-12	159	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <b>RASGNIYNYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKTLAD</b> GVPSRFSGSSSGTDYFTFISSLQP EDIATYYC <b>QHFWTLPYT</b> FGQGTKLQIT

ES 2 635 594 T3

Clon	SEQ ID NO:	Secuencia
		1234567890123456789012345678901234567890
J348S2-44	160	GIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC <b>RASGNIYNYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKTLAD</b> GVPSRFSGSSSGTDYFTLTISSLQP EDIATYYC <b>QHFWTLPYI</b> FGQGTKLQIT
J348S2-37	161	GIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC <b>RASGNIYTYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKTLAD</b> GVPSRFSGSGSGTDYFTTISSLQP EDIATYYC <b>QHFWTLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-74	162	GIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC <b>RASGNIYQYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKTLAD</b> GVPSRFSGSGSGTDYFTTISSLQP EDIATYYC <b>QHFWTLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-57	163	GIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC <b>RASGNIYNYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKTLAD</b> GVPSRFSGSGSGTDYFTTISSLQP EDIATYYC <b>QHFWTLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-16	164	GIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC <b>RASGNIYDYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKTLAD</b> GVPSRFSGSCSGTDYFTTISSLQP EDIATYYC <b>QHFWTLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-33	165	GIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC <b>RASGNIYDYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKTLAD</b> GVPSRFSGSCSGTDYFTTISSLQP EDIATYYC <b>QHFWSLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-20	166	GIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC <b>RASGNIYNYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKTLAD</b> GVPSRFSGSCSGTDYFTTISSLQP EDIATYYC <b>QHFWKLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-15	167	GIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC <b>RASGNIYKYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>DAKTLAD</b> GVPSRFSGVSVDYFTTISSLQP EDIATYYC <b>QHFWRLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-48	168	GIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC <b>RASGNIYKYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>DAKTLAD</b> GVPSRFSGSSSGTDYFTTISSLQP EDIATYYC <b>QHFWRLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-32	169	GIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC <b>RASGNIYHYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>DAKNLAD</b> GVPSRFSGSCSGTDYFTTISSLQP EDIATYYC <b>QHFWSLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-49	170	GIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC <b>RASGNIYHYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>DAKTLAD</b> GVPSRFSGSSSGTDYFTTISSLQP EDIATYYC <b>QHFWSLPYT</b> FGQGTKLQIT

ES 2 635 594 T3

Clon	SEQ ID NO:	Secuencia
		1234567890123456789012345678901234567890
J348S2-78	171	GIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC <b>RASGNIYQYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>DAKILAD</b> GVPSRFSGSSSGTDYFTFISSLQP EDIATYYC <b>QHFVKLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-96	172	GIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC <b>RASGNIYHYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>DAKILAD</b> GVPSRFSGSSSGTDYFTFISSLQP EDIATYYC <b>QHFVKLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-1	173	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC <b>RASGNIYGWLA</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>QAKTLM</b> DGVPSRFSGSGSGTDYFTFISSLQP EDIATYYC <b>QHFWNIPAT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-25	174	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC <b>RASGNIYTYLN</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>DAKTLAD</b> GVPSRFSGSSSGTDYFTFISSLQP EDIATYYC <b>QHFWRLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-34	175	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC <b>RASGNIYTYLN</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKELAE</b> GVPSRFSGSGSGTDYFTFISSLQP EDIATYYC <b>QHFWRLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-65	176	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC <b>RASGNIYTYLN</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKSLAD</b> GVPSRFSGSCSGTDYFTFISSLQP EDIATYYC <b>QHFWRIPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-90	177	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC <b>RASGNIYTYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>DAKTLAD</b> GVPSRFSGSSSGTDYFTFISSLQP EDIATYYC <b>QHFVKLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-56	178	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC <b>RASGNIYNYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKNLAD</b> GVPSRFSGVSVDYFTFISSLQP EDIATYYC <b>QHFWRLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-61	179	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC <b>RASGNIWHYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>DAKTLAD</b> GVPSRFSGSSSGTDYFTFISSLQP EDIATYYC <b>QHFWRLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-80	180	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC <b>RASGNIYHYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKTLAS</b> GVPSRFSGSSSGTDYFTFISSLQP EDIATYYC <b>QHFVKLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-94	181	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC <b>RASGNIYDYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKILAD</b> GVPSRFSGSGSGTDYFTFISSLQP EDIATYYC <b>QHFWMPLYT</b> FGQGTKLQIT

Clon	SEQ ID NO:	Secuencia
		1234567890123456789012345678901234567890
J348S2-14	182	GIQMTQSPSSLSASVGDRTTITC <b>RASGNIYTYLT</b> WYQQIP GKAPKLLIY <b>DAKTLAE</b> GVPSRFSGSGSGTDYFTFTISLQP EDIATYYC <b>QHFWKLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-58	183	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITC <b>RASGNIHYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKTLAE</b> GVPSRFSGSCSGADYFTFTISLQP EDIATYYC <b>QHFWKLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-95	184	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITC <b>RASGNIYNYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKTLAE</b> GVPSRFSGSDSGTDYFTFTISLQP EDIATYYC <b>QHFWKLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-42	185	GIQMTQSPSSLSASVGDRTTITC <b>RASGNIYNYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKTLAA</b> GVPSRFSGSGSGTDYFTFTISLQP EDIATYYC <b>QHFWKLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-45	186	GIQMTQSPSSLSASVGDRTTITC <b>RASGNIYNYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKTLAE</b> GVPSRFSGSGSGTDYFTFTISLQP EDIATYYC <b>QHFWKLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-17	187	GIQMTQSPSSLSASVGDRTTITC <b>RASGNIYNYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKTLAE</b> GVPSRFSGSSSGTDYFTFTISLQP EDIATYYC <b>QHFWTLPYT</b> FGQGTKLQIT
J348S2-53	188	GIQMTQSPSSLSASVGDRTTITC <b>RASGNIYGYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKTLAE</b> GVPSRFSGSGSGTDYFTFTISLQP EDIATYYC <b>QHFWTLPYN</b> FGQGTKLQIT
J348S2-47	189	GIQMTQSPSSLSASVGDRTTITC <b>RASGNIYDYLT</b> WYQQTP GKAPKLLIY <b>NAKTLAE</b> GVPSRFSGSGSGTDYFTFTISLQP EDIATYYC <b>QHFWTLPYT</b> FGQGTKLQIT

Las secuencias de las CDRs individuales de las regiones VH y VL de los anticuerpos de IL-1 $\beta$  madurados por afinidad procedentes de E26 humanizado en las tablas anteriores, se pueden alinear para proporcionar secuencias de CDRs de consenso tales como las de la Tabla 9.

5

**Tabla 9. Secuencia de consenso para secuencias de VH y VL maduradas por afinidad**

Región de CDR	Identificador de Secuencia	Secuencia de consenso
CDR-H1	SEQ ID NO:190	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> <b>S Y D M S</b> <b>K</b> <b>R</b>



Región de CDR	Identificador de Secuencia	Secuencia de consenso
CDR-H2	SEQ ID NO:191	$X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11} X_{12} X_{13} X_{14} X_{15} X_{16} X_{17}$ <b>Y I S S G G G G T Y Y P D T V K G</b> <b>V H A S A</b>
CDR-H3	SEQ ID NO:192	$X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10}$ <b>G G V T K G Y F D V</b> <b>Y C E</b> <b>L</b> <b>M</b> <b>Q</b> <b>Y</b>
CDR-L1	SEQ ID NO:193	$X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11}$ <b>R A S G N I H N Y L T</b> <b>Y G W A</b> <b>W T N</b> <b>Q</b> <b>E</b> <b>H</b> <b>D</b> <b>K</b>
CDR-L2	SEQ ID NO:194	$X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7$ <b>N A K T L A D</b> <b>Q N M E</b> <b>D I E S</b> <b>E A</b> <b>S</b>
CDR-L3	SEQ ID NO:195	$X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9$ <b>Q H F W S I P Y T</b> <b>Q N L A I</b> <b>T N</b> <b>K</b> <b>R</b> <b>M</b>

Las secuencias de la Tabla 10 se convirtieron en IgG para una caracterización adicional. El clon E26.13 se mutó en la región J de la región pesada y ligera variable, denominadas E26.13 JM VH y E26.13 JM VL, respectivamente, para eliminar mutaciones de la región estructural que no eran de la línea germinal. Los residuos de aminoácidos de las CDRs individuales se indican en negrita.

5

**Tabla 10. Secuencias de aminoácidos de variantes de VH y VL de E26 maduras por afinidad**

SEQ ID NO:	Región de la proteína	Secuencia
------------	-----------------------	-----------

ES 2 635 594 T3

				123456789012345678901234567890
196	E26.1 VH			EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFI FISKYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISHGGAGTY YIPDSVKGRFTISRDNKNTLFLQMDSLRAED TGVYYCARGGVYKGYFDEWQGQTPVTVSS
	E26.1 VH	CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO:196	KYDMS
	E26.1 VH	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO:196	YISHGGAGTYYPDSVKG
	E26.1 VH	CDR-H3	Residuos 99-108 de SEQ ID NO:196	GGVYKGYFDE
197	E26.1 VL			DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASGNIY GWLAWYQQTPGKAPKLLIYQAKTLMDGVPS RFSGSGSGTDYFTFTISLQPEDIATYYCQH FWNIPATFGQGTKLQIT
	E26.1 VL	CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO:197	RASGNIYGWLA
	E26.1 VL	CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO:197	QAKTLMD
	E26.1 VL	CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO:197	QHFWNIPAT
198	E26.2 VH			EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFI FISKYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISHGGAGTY YIPDSVVKGRFTISRDNKNTLFLQMDSL LRPEDTGVYFCARGGVTKGYFDVWQGQTPVTVSS
	E26.2 VH	CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO:198	KYDMS
	E26.2 VH	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO:198	YISHGGAGTYYPDSVKG
	E26.2 VH	CDR-H3	Residuos 99-108 de SEQ ID NO:198	GGVTKGYFDV
				Igual que el parental
199	E26.2 VL			DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASGNIH NYLTWYQQTPGKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYFTFTISLQPEDIATYYCQH FWSIPYTFGQGIKLQIT

ES 2 635 594 T3

SEQ ID NO:	Región de la proteína		Secuencia
			123456789012345678901234567890
	E26.2 VL	CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO:199 <b>RASGNIHNYLT</b>
	E26.2 VL	CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO:199 <b>NAKTLAD</b>
	E26.2 VL	CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO:199 <b>QHFWSIPYT</b>
200	E26.11 VH		EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSRYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDSVKGREFTISRDN SKNTLFLQMDSLRPEDTAVYYCARGGVYKGYFDVWGQGTPTVSS
	E26.11 VH	CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO:200 <b>RYDMS</b>
	E26.11 VH	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO:200 <b>YISHGGAGTYYPDSVKG</b>
	E26.11 VH	CDR-H3	Residuos 99-108 de SEQ ID NO:200 <b>GGVYKGYFDV</b>
201	E26.11 VL		DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASGNIHNYLTWYQQTPGKAPKLLIYNAKTLADGVPSRFSGSGSGTDYIFTISLQPEDIATYYCQHFW SIPYTFGQGTKLQIT
	E26.11 VL	CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO:201 <b>RASGNIHNYLT</b>
	E26.11 VL	CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO:201 <b>NAKTLAD</b>
	E26.11 VL	CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO:201 <b>QHFWSIPYT</b>
202	E26.12 VH		EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSRYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDSVKGREFTISRDN SKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCARGGVTKGYFDVWGQGTPTVSS
	E26.12 VH	CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO:202 <b>RYDMS</b>
	E26.12 VH	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO:202 <b>YISHGGAGTYYPDSVKG</b>

ES 2 635 594 T3

SEQ ID NO:	Región de la proteína			Secuencia
				123456789012345678901234567890
	E26.12 VH	CDR-H3	Residuos 99-108 de SEQ ID NO : 202	GGVTKGYFDV
203	E26.12 VL			Igual que el parental
				DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASGNIH NYLTWYQQTPGKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYFTFTISSLPEDIATYYCQH FWSIPYTFGGTKLQIT
	E26.12 VL	CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO:203	RASGNIHNYLT
	E26.12 VL	CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO:203	NAKTLAD
	E26.12 VL	CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO:203	QHFWSIPYT
204	E26.13 VH			EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFI RYDMSWVRQAPGKLEWVAYISHGGAGTY PDSVKGRFTISRDNKNIIFLQMDSLRPED TGVYFCARGGVTKGYFDVWGQGTPTVSS
	E26.13 VH	CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO:204	RYDMS
	E26.13 VH	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO:204	YISHGGAGTYYPDSVKG
	E26.13 VH	CDR-H3	Residuos 99-108 de SEQ ID NO:204	GGVTKGYFDV
205	E26.13 VL			Igual que el parental
				DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASGNIH NYLTWYQQTPGKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYFTFTISSLPEDIATYYCQH FWSIPYTFGGTKLQIT
	E26.13 VL	CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO:205	RASGNIHNYLT
	E26.13 VL	CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO:205	NAKTLAD
	E26.13 VL	CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO:205	QHFWSIPYT

SEQ ID NO:	Región de la proteína		Secuencia
			123456789012345678901234567890
206	E26.13 JM VH		EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFI FSDYMEWVRQAPGKGLWVA <b>YISHGGAGTY</b> PDSV <b>KGRFT</b> ISRDN <b>SKN</b> LF <b>LQ</b> MDSL <b>RP</b> ED TGVYFCAR <b>GGVTKGYFDV</b> WGQGTITV <b>V</b> SS
	E26.13 JM VH	CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO:206 <b>RYDMS</b>
	E26.13 JM VH	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO:206 <b>YISHGGAGTYYPDSVKG</b>
	E26.13 JM VH	CDR-H3	Residuos 99-108 de SEQ ID NO:206 <b>GGVTKGYFDV</b>
207	E26.13 JM VL		DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCR <b>RASGNIH</b> NYLTWYQQTPGKAPKLLI <b>YNAKTLAD</b> GVPS RFSGSGSGTDYIFTIS <b>SLQ</b> PEDIAT <b>YYCQH</b> FWSIPYTFGQGI <b>KLEIKR</b>
	E26.13 JM VL	CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO:207 <b>RASGNIHNYLT</b>
	E26.13 JM VL	CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO:207 <b>NAKTLAD</b>
	E26.13 JM VL	CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO:207 <b>QHFWSIPYT</b>
208	E26.35 VH		EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFI FSDYMEWVRQAPGKGLWVA <b>YISHGGAGTY</b> PDSV <b>KGRFT</b> ISRDN <b>SKN</b> LF <b>LQ</b> MDSL <b>RA</b> ED TAVYYCAR <b>GGVYKGYFDV</b> WGQGTITV <b>V</b> SS
	E26.35 VH	CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO:208 <b>RYDMS</b>
	E26.35 VH	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO:208 <b>YISHGGAGTYYPDSVKG</b>
	E26.35 VH	CDR-H3	Residuos 99-108 de SEQ ID NO:208 <b>GGVYKGYFDV</b>
209	E26.35 VL		DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCR <b>RASGNIH</b> NYLTWYQQTPGKAPKLLI <b>YNAKTLAD</b> GVPS RFSGSGSGTDYIFTIS <b>SLQ</b> PEDIAT <b>YYCQH</b> FWSIPYTFGQGI <b>KLQIT</b>

SEQ ID NO:	Región de la proteína		Secuencia
			123456789012345678901234567890
	E26.35 VL	CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO:209 <b>RASGNIHNYLT</b>
	E26.35 VL	CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO:209 <b>NAKTLAD</b>
	E26.35 VL	CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO:209 <b>QHFWSIPYT</b>
210	E26.37 VH		EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFISS <b>KYDMS</b> WVRQAPGKGLEWVA <b>YISHGGAGTY</b> <b>PDSVKGR</b> FRTISRDN SKNTLFLQMDSLRPED TGVYYCARG <b>GGVYKGYFDV</b> WGQGTPTVTVSS
	E26.37 VH	CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID NO:210 <b>KYDMS</b>
	E26.37 VH	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO:210 <b>YISHGGAGTYYPDSVKG</b>
	E26.37 VH	CDR-H3	Residuos 99-108 de SEQ ID NO:210 <b>GGVYKGYFDV</b>
211	E26.37 VL		DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCR <b>RASGNIY</b> <b>TYLT</b> WYQQTPGKAPKLLI <b>YNAKTLAD</b> GVPS RFGSGSGTDYFTFTISLQPEDIA <b>TYCQH</b> <b>FWTL</b> PYTFGGGTKLQIT
	E26.37 VL	CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO:211 <b>RASGNIYTYLT</b>
	E26.37 VL	CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO:211 <b>NAKTLAD</b>
	E26.37 VL	CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO:211 <b>QHFWTLPYT</b>

**Ejemplo 2: Caracterización funcional de anticuerpos de IL-1 $\beta$**

**Ejemplo 2.1: Protocolo del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas para IL-1 $\beta$**

5 Para determinar si los AcMos anti-IL-1 $\beta$  se unen a IL-1 $\beta$  humana, se incubaron placas de ELISA (Nunc, MaxiSorp, Rochester, Nueva York) durante una noche a 4°C con anticuerpo anti-Fc humano diluido en tampón Pierce Coat a 2  $\mu$ g/ml (Jackson Immunoresearch, West Grove, Pennsylvania). Las placas se lavaron cinco veces en tampón de lavado (PBS que contenía 0,05% de Tween 20) y se bloquearon durante 1 hora a 25°C con 200  $\mu$ l por pocillo de tampón de bloqueo Superblock (Thermo Scientific, n° 37515). El tampón de bloqueo se eliminó mediante placas de extracción de fluido, y se añadieron 2  $\mu$ g/ml de cada anticuerpo en PBS que contenían 10% de Superblock, 0,5% de Tween-20 a los pocillos a 100  $\mu$ l/pocillo y se incubaron a 25°C durante 1 hora. Los pocillos se lavaron cinco veces en 1XPBST y 1  $\mu$ g/ml de antígeno biotinilado se tituló en diluciones en serie de 1:6 (para un intervalo de  $\mu$ g en PBS que contenía 10% de Superblock, 0,05% de Tween 20). A continuación, se añadió cada dilución de antígeno a las placas y se incubaron durante 1 hora a 25°C. Los pocillos se lavaron cinco veces en 1XPBST y se incubaron durante 1 hora

10

a 25°C con estreptavidina poliHRP (KPL n° 474-3000, Gaithersburg, Maryland). Los pocillos se lavaron cinco veces en 1XPBST y se añadieron a cada pocillo 100 µl de ULTRA-TMB ELISA (Pierce, Rockford, Illinois). Tras el desarrollo del color, se detuvo la reacción con HCl 1 N y se midió la absorbancia a 450 nM. Los resultados se muestran en la Tabla 11 y el valor numérico indica la unión de anticuerpos anti-IL-1β a IL-1β humana.

5

**Tabla 11. Unión de anticuerpos a IL-1β humana mediante ELISA**

AcMo	CE50 en ELISA de hIL-1β (pM)
E26.1	12,9
E26.2	567
E26.11	14
E26.12	306
E26.13	7,2
E26.13 JM	7,4
E26.35	10,4
E26.37	17,7

**Ejemplo 2.2: Potencia neutralizadora de los anticuerpos de IL-1β**

Para examinar la actividad funcional de los anticuerpos anti-IL-1β humana en la invención, los anticuerpos se utilizaron en un ensayo con MRC-5 que mide la capacidad del anticuerpo para inhibir la actividad de IL-1β. La línea celular MRC-5 es una línea celular de fibroblastos de pulmón humano que produce IL-8 como respuesta a IL-1β humana de una manera dependiente de la dosis. Esta línea celular también produce IL-8 como respuesta a IL-1β de mono cynomolgus (IL-1β cyno). Las células MRC-5 se obtuvieron originalmente de la ATCC y se subcultivaron en MEM completo y 10% de FBS y se cultivaron a 37°C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>. Para determinar la potencia neutralizadora de un anticuerpo frente a IL-1β, se añadieron los anticuerpos (50 µl) a una placa de 96 pocillos (intervalo de concentración final 1E-7 a 1E-15 M) y se preincubaron con 50 µl de IL-1β humana o cyno (50 pg/ml de concentración final) durante 1 hora a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Los complejos de anticuerpo y antígeno (100 µl) se añadieron a continuación a las células MRC-5 (extendidas en placas 24 horas antes, a una concentración de 1E5/ml a 100 µl de células/pocillo). Las placas del ensayo se incubaron durante una noche a 37°C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>. La potencia de los anticuerpos se determinó por su capacidad para inhibir la producción de IL-8. La producción de IL-8 humana se midió mediante un ensayo basado en la quimioluminiscencia. La Tabla 12 resume las potencias de los anticuerpos frente a IL-1β humana y cyno.

10

15

20

**Tabla 12. Potencia neutralizadora de los anticuerpos de IL-1β**

AcMo anti-IL-1β	Potencia (pM)	
	hIL-1β (pM)	IL-1β (pM) cyno
E26.1	9,7	ND
E26.13	15,7	8,4
E26.35	7,2	3,0
E26.37	2,2	ND

ND: No determinada.

**Ejemplo 2.3: Medición de la afinidad de los anticuerpos de IL-1β mediante resonancia de plasmón superficial**

El ensayo BIACORE (Biacore, Inc., Piscataway, New Jersey) determina la afinidad de los anticuerpos con mediciones cinéticas de las constantes de la tasa de asociación y disociación. La unión de los anticuerpos a IL-1β humana purificada recombinante e IL-1β de mono cynomolgus se determinó mediante mediciones basadas en resonancia de plasmón superficial, con un instrumento Biacore® 3000 (Biacore® AB, Uppsala, Suecia) empleando un tampón de migración HBS-EP (HEPES 10 mM [pH 7,4], NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y 0,005% de tensioactivo P20) a 25°C. Todos los productos químicos se obtuvieron a partir de Biacore® AB (Uppsala, Suecia) o de otra manera a partir de una fuente diferente, como se describe en el presente documento. Aproximadamente 5000 UR de IgG de cabra anti-ratón, (Fcy), anticuerpo policlonal específico de fragmento (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, Illinois) diluido en acetato de sodio 10 mM (pH 4,5) se inmovilizaron directamente a través de un chip biosensor de calidad de investigación de CM5 utilizando un kit de acoplamiento de amina convencional, de acuerdo con las instrucciones

25

30

5 y los procedimientos del fabricante a 25 µg/ml. Los restos sin reaccionar sobre la superficie del biosensor se bloquearon con etanolamina. La superficie modificada con carboximetil dextrano en las celdas de flujo 2 y 4 se utilizó como superficie de reacción. Como superficie de referencia se utilizaron las celdas de flujo 1 y 3 sin IgG de cabra anti-ratón sin modificar con carboximetil dextrano. Para el análisis cinético, las ecuaciones de las tasas obtenidas a partir de un modelo de unión de Langmuir 1:1, se ajustaron al mismo tiempo para las fases de asociación y disociación de las ocho inyecciones (utilizando un análisis de ajuste global) con el uso del programa informático Biaevaluation 4.0.1. Los anticuerpos purificados se diluyeron en solución salina tamponada con HEPES para la captura a través de superficies de reacción específicas de IgG de cabra anti-humana. Los anticuerpos que se iban a capturar como ligando (25 µg/ml) se inyectaron sobre matrices de reacción con un caudal de 5 µl/minuto. Las constantes de la tasa de asociación y disociación,  $K_{on}$  (unidad  $M^{-1} s^{-1}$ ) y  $K_{off}$  (unidad  $s^{-1}$ ) se determinaron bajo un caudal continuo de 25 µl/min. Las constantes de las tasas se obtuvieron haciendo mediciones de la unión cinética con diez concentraciones de antígeno diferentes en el intervalo de 10 - 200 nM. La constante de disociación en equilibrio (unidad M) de la reacción entre los anticuerpos y el antígeno diana, se calculó entonces a partir de las constantes de las tasas cinéticas mediante la siguiente fórmula:  $K_D = k_{off}/k_{on}$ . La unión se registra como una función del tiempo y se calculan las constantes de las tasas cinéticas. En este ensayo, se pueden medir tasas de asociación tan rápidas como  $10^6 M^{-1} s^{-1}$  y tasas de disociación tan lentas como  $10^{-6} s^{-1}$ . La Tabla 13 muestra las mediciones de la afinidad para anticuerpos anti-IL-1β humana.

**Tabla 13. Afinidad de los anticuerpos frente a IL-1β humana y IL-1β cyno mediante Biacore**

	IL-1β humana	IL-1β cyno
<b>E26.2 (M)</b>	<b>5,28 x 10<sup>-11</sup></b>	<b>ND</b>
Kon (1/Ms)	8,95 x 10 <sup>5</sup>	<b>ND</b>
Koff (1/s)	4,72 x 10 <sup>-5</sup>	<b>ND</b>
<b>E26.12 (M)</b>	<b>7,86 x 10<sup>-11</sup></b>	<b>ND</b>
Kon (1/Ms)	9,33 x 10 <sup>5</sup>	<b>ND</b>
Koff (1/s)	7,37 x 10 <sup>-5</sup>	<b>ND</b>
<b>E26.13 (M)</b>	<b>4,45 x 10<sup>-11</sup></b>	<b>1,46 x 10<sup>-11</sup></b>
Kon (1/Ms)	9,5 x 10 <sup>5</sup>	1,23 x 10 <sup>6</sup>
Koff (1/s)	4,23 x 10 <sup>-5</sup>	1,79 x 10 <sup>-5</sup>
<b>E26.35 (M)</b>	<b>2,39 x 10<sup>-11</sup></b>	<b>1,4 x 10<sup>-11</sup></b>
Kon (1/Ms)	1,02 x 10 <sup>6</sup>	9,21 x 10 <sup>5</sup>
Koff (1/s)	2,50 x 10 <sup>-5</sup>	1,29 x 10 <sup>-5</sup>

ND: No determinada.

20 **Ejemplo 3: Generación de moléculas IL-1α/β DVD-Ig®**

**Ejemplo 3.1: Construcción de estructuras artificiales de ADN de IL-1α/β DVD-Ig**

25 Un dominio variable del anticuerpo anti-IL-1α ("X3"; véase, el documento de publicación PCT nº WO 95/14780) se combinó con varios dominios variables del anticuerpo de IL-1β en un formato de DVD-Ig (Wu et al., Nature Biotechnol., 25: 1290-1297 (2007); documento de publicación PCT nº WO 2007/024715 A2) mediante amplificación con PCR solapante con secuencias de ADN del enlazador intercaladas. X3 también se mutó en la región J de la región pesada y ligera variable, denominadas X3 JM VH y X3 JM VL, respectivamente, para eliminar las mutaciones de la región estructural que no eran de la línea germinal. Los productos de la PCR amplificados se subclonaron en vectores de expresión adecuados para una expresión transitoria en células HEK293 y las regiones con marco de lectura abierto se confirmaron mediante secuenciación antes de la expresión de DVD-Ig.

30 **Ejemplo 3.2: Expresión y producción de proteínas de unión IL-1α/β DVD-Ig**

35 Después de la confirmación de la secuencia de ADN, todas las estructuras artificiales de ADN de DVD-Ig se expandieron en *E. coli* y los ADNs se purificaron utilizando Hispeed Maxi Prep de Qiagen (nº de catálogo 12662, QIAGEN). El ADN de DVD-Ig se transfectó en células 293E en fase logarítmica ( $0,5 \times 10^6$ /ml, viabilidad >95%) mezclando PEI y ADN en una relación de 2:1 con 0,2 µg/ml de ADN de la cadena pesada y 0,3 µg/ml de ADN de la cadena ligera. El complejo de ADN:PEI se formó a temperatura ambiente en una campana TC durante quince minutos, antes de añadir las células 293E. Veinticuatro horas más tarde, se añadió 0,5% de TN1 a las células 293E. El día cinco, se recogió el material sobrenadante para la medición del título de IgG1 humana. El material sobrenadante de las células se recogió el día siete y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm de PES. El material



sobrenadante se purificó mediante el uso de cromatografía de afinidad con proteína A y sefarosa, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las DVD-Igs purificadas eluyeron de la columna mediante glicina 0,1 M (pH 2,99) y se dializaron en tampón de histidina 15 mM (pH 6,0) inmediatamente. Las proteínas de unión se cuantificaron mediante A280 y se analizaron por espectrometría de masas y SEC.

5 **Ejemplo 3.3: Secuencias de estructuras artificiales de IL-1 $\alpha$ / $\beta$  DVD-Ig**

Se determinaron las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de proteínas DVD-Ig capaces de unirse a IL-1 $\beta$  humana e IL-1 $\alpha$  humana. Las secuencias de aminoácidos de las regiones de la cadena pesada variable (VH), la cadena ligera variable (VL), la cadena ligera constante (CL) y la cadena pesada constante (CH) de las proteínas de unión IL-1 $\alpha$ / $\beta$  DVD-Ig se muestran en la Tabla 14, a continuación. En la Tabla 14, las secuencias de aminoácidos para las regiones VL de E26.13 y E26.35 se designan SEQ ID NO: 238 y SEQ ID NO: 239, respectivamente, en lugar de SEQ ID NO: 205 y SEQ ID NO: 209 como se ha mostrado anteriormente en la Tabla 10, para dar cuenta de la inclusión de un residuo de arginina (R) C-terminal. Los expertos en la técnica de modificación genética de anticuerpos entienden que este residuo de arginina C-terminal es el residuo de aminoácido en la unión de las regiones kappa de VL y CL en una molécula de IgG y, a veces se incluye en la región CL o, como en la Tabla 14 a continuación, la región VL.

**Tabla 14. Secuencias de regiones variables y constantes de proteínas de unión IL-1 $\alpha$ / $\beta$  DVD-Ig**

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia
Región proteica		12345678901234567890
<b>E26.13-SS-X3 DVD-Ig PESADA VARIABLE</b>	<b>SEQ ID NO:212</b>	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSR YDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTY Y PDSVKGRFTISRDN SKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCARGG VTKGYFDVWGQGTPTVSSA STKGPQVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCTASGFTFSMFGVH WVRQAPGKGLEWVA AVSYDG SNKYAESVKGRFTISRDN S KNILFLQMDSLRLEDTAVYY CARGRPKVVIPAPLAHWGQG TLVTFSS
<b>E26.13 VH</b>	<b>SEQ ID NO:204</b>	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSR YDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTY Y PDSVKGRFTISRDN SKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCARGG VTKGYFDVWGQGTPTVSS
<b>ENLAZADOR</b>	<b>SEQ ID NO:33</b>	<b>ASTKGP</b>
<b>X3 VH</b>	<b>SEQ ID NO:213</b>	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCTASGFTFSMFGVHWVRQA PGKGLEWVA AVSYDGSNKYY AESVKGRFTISRDN SKNIFL LQMDSLRLEDTAVYYCARGR PKVVIPAPLAHWGQGT LVTFS SS
<b>CH</b>	<b>SEQ ID NO:214</b>	

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia
Región proteica		12345678901234567890
		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTICVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSEFLYSLKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
<b>E26.13-SS-X3 DVD-Ig LIGERA VARIABLE</b>	<b>SEQ ID NO:215</b>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYFTTISLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ
		<u>GTKLQITRIVAAP</u> DIQMTQS PSSVSASVGDRVTITCRASQ GISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYEASNLETGVPSRFSGSGS GSDFTLTISLQPEDFATYY CQQTSSFLLSFGGGTKVEHK R
<b>E26.13 VL</b>	<b>SEQ ID NO:238</b>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYFTTISLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLQITR
<b>ENLAZADOR</b>	<b>SEQ ID NO:35</b>	<b>TVAAP</b>
<b>X3 VL</b>	<b>SEQ ID NO:216</b>	DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISSWLAWYQQK GKAPKLLIYEASNLETGVPS RFSGSGSGSDFTLTISLQP EDFATYYCQQTSSFLLSFGG GTKVEHKR
<b>CL</b>	<b>SEQ ID NO:5</b>	

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia
Región proteica		12345678901234567890
		TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS ENRGEK
<b>E26.13-LL-X3 DVD-Ig PESADA VARIABLE</b>	<b>SEQ ID NO:217</b>	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSRDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCARGG VTKGYFDVWGQGPVTVSSA STKGPSVFPLAPQVQLVESG GGVVQPGRSLRLSCTASGFT FSMFVHWVRQAPGKGLEWV AAVSYDGSNKYYAESVKGRF TISRDNKNTLFLQMDSLRL EDTAVYYCARGRPKVVIPAP LAHWGQGTLVTFSS
<b>E26.13 VH</b>	<b>SEQ ID NO:204</b>	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSRDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCARGG VTKGYFDVWGQGPVTVSS
<b>ENLAZADOR</b>	<b>SEQ ID NO:34</b>	ASTKGPSVFPLAP
<b>X3 VH</b>	<b>SEQ ID NO:213</b>	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCTASGFTFSMFVHWVRQA PGKGLEWVAVSYDGSNKYY AESVKGRFTISRDNKNTLF
		LQMDSLRLEDTAVYYCARGR PKVVIPAPLAHWGQGTLVTF SS
<b>CH</b>	<b>SEQ ID NO:214</b>	

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia
Región proteica		12345678901234567890
		ASTKGPSVFLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSQVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVHLQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
<b>E26.13-LL-X3 DVD-Ig LIGERA VARIABLE</b>	<b>SEQ ID NO:218</b>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYFTFTISLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLQITRTVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISWLAWYQQK GKAPKLLIYEASNLETGVPS RFSGSGSGSDFTLTISLQP EDFATYYCQQTSSFLSFGG GTKVEHKKR
<b>E26.13 VL</b>	<b>SEQ ID NO:238</b>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYFTFTISLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLQITR
<b>ENLAZADOR</b>	<b>SEQ ID NO:36</b>	<b>TVAAPSVFIFPP</b>
<b>X3 VL</b>	<b>SEQ ID NO:216</b>	DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISWLAWYQQK GKAPKLLIYEASNLETGVPS RFSGSGSGSDFTLTISLQP EDFATYYCQQTSSFLSFGG GTKVEHKKR
<b>CL</b>	<b>SEQ ID NO:5</b>	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNFFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia
Región proteica		12345678901234567890
		FNRGEC
<b>X3-SS- E26.13 DVD-Ig PESADA VARIABLE</b>	<b>SEQ ID NO:219</b>	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRL  SCTASGFTFSMFGVHWVRQA  PGKGLEWVAAVSYDGSNKYY  AESVKGRFTISRDN SKNILF  LQMDSLRLEDTAVYYCARGR  PKVVIPAPLAHWGQGLVTF  SSASTKGP EVQLVESGGGVV  QPGRSLRLSCSASGFIFSR  DMSWVRQAPGKGLEWVAYIS  HGGAGTYYPDSVKGRFTISR  DNSKNTLFLQMDSLRPEDTG  VYFCARGGVTKGYFDVWGQG  TPVTVSS</p>
<b>X3 VH</b>	<b>SEQ ID NO:213</b>	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRL  SCTASGFTFSMFGVHWVRQA  PGKGLEWVAAVSYDGSNKYY  AESVKGRFTISRDN SKNILF  LQMDSLRLEDTAVYYCARGR  PKVVIPAPLAHWGQGLVTF  SS</p>
<b>ENLAZADOR</b>	<b>SEQ ID NO:33</b>	<b>ASTKGP</b>
<b>E26.13 VH</b>	<b>SEQ ID NO:204</b>	<p>EVQLVESGGGVVQPGRSLRL  SCSASGFIFSRDMSWVRQA  PGKGLEWVAYISHGGAGTY  PDSVKGRFTISRDN SKNLF  LQMDSLRPEDTG VYFCARGG  VTKGYFDVWGQGLVTVSS</p>
<b>CH</b>	<b>SEQ ID NO:214</b>	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG  GTAALGCLVKDYFPEPVTVS  WNSGALTSGVHTFPAVLQSS  GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT  YICNVNHKPSNTKVDKKEP  KSCDKHTHTCPPCPAPEAAGG  PSVFLFPPKPKDTLMI SRTP  EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW  YVDGVEVHNAKTKPREEQYN  STYRVVSVLTVLHQDWLNGK  EYKCKVSNKALPAPIEKTIS  KAKGQPREPQVYTLPPSREE  MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  AVEWESNGQPENNYKTTTPV  LDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  QQGNVFCSSVMHEALHNHYT  QKSLSLSPGK</p>
<b>X3-SS- E26.13 DVD-Ig LIGERA VARIABLE</b>	<b>SEQ ID NO:220</b>	

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia
Región proteica		12345678901234567890
		<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVT                      ITCRASQGISSWLAWYQQKP                      GKAPKLLIYEASNLETGVPS                      RFSGSGSGSDFTLTISLQP                      EDFATYYCQQTSSFLLSFGG</p>
		<p>GTKVEHKRTVAAPDIQMTQS                      PSSLSASVGDRVTITCRASG                      NIHNYLTWYQQTPGKAPKLL                      IYNAKTLADGVPSRFSGSGS                      GTDYTFTISSLQPEDIATYY                      CQHFWSIPYTFGGQTKLQIT                      R</p>
X3 VL	SEQ ID NO:216	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVT                      ITCRASQGISSWLAWYQQKP                      GKAPKLLIYEASNLETGVPS                      RFSGSGSGSDFTLTISLQP                      EDFATYYCQQTSSFLLSFGG                      GTKVEHKR</p>
ENLAZADOR	SEQ ID NO:35	TVAAP
E26.13 VL	SEQ ID NO:238	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVT                      ITCRASGNIHNYLTWYQQTP                      GKAPKLLIYNAKTLADGVPS                      RFSGSGSGTDYFTFTISSLQP                      EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ                      GTKLQITR</p>
CL	SEQ ID NO:5	<p>TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG                      TASVVCLLNMFYPREAKVQW                      KVDNALQSGNSQESVTEQDS                      KDSTYLSSTLTLSKADYEK                      HKVYACEVTHQGLSSPVTKS                      FNRGEC</p>
X3-LL- E26.13 DVD-Ig PESADA VARIABLE	SEQ ID NO:221	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRL                      SCTASGFTFSMFGVHWVRQA                      PGKGLEWVAAVSYDGSNKYY                      AESVKGRFTISRDNKNIIF                      LQMDSLRLLEDTAVYYCARGR                      PKVVIAPLAHWGQGLVTF                      SSASTKGPSVFPLAPEVQLV                      ESGGGVVQPGRSLRLSCSAS                      GFIFSRDYDMSWVRQAPGKGL                      EWWAYISHGGAGTYYPDSVK                      GRFTISRDNKNTLFLQMDS                      LRPEDTGVYFCARGGVTKGY                      FDVWGQGPVTVSS</p>

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia
Región proteica		12345678901234567890
<b>X3 VH</b>	<b>SEQ ID NO:213</b>	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCTASGFTFSMFGVHWVRQA PGKGLEWVA AVSYDGSNKYY AESVKGRFTISRDN SKNILF LQMDSLRLEDTAVYYCARGR PKVVIPAPLAHWGQGTLVTF SS
<b>ENLAZADOR</b>	<b>SEQ ID NO:34</b>	ASTKGPSVFPLAP
<b>E26.13 VH</b>	<b>SEQ ID NO:204</b>	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSR YDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTY Y
		<u>PDSVKGRFTISRDN SKNTLF</u> LQMDSLRPEDTGVYFCARGG <u>VTKGYFDVWGQGTPTVTVSS</u>
<b>CH</b>	<b>SEQ ID NO:214</b>	<u>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDK KVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMI SRTP EVTICVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNV FSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
<b>X3-LL- E26.13 DVD-Ig LIGERA VARIABLE</b>	<b>SEQ ID NO:222</b>	DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP GKAPKLLIYEASNLETGVPS RFSGSGSGSDFTLTISLQP EDFATYYCQQTSSFLSF GG GKVEHKRTVAAPS VFIFPP <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVT</u> ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYFTTISLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLQITR
<b>X3 VL</b>	<b>SEQ ID NO:216</b>	

<b>Proteína</b>	<b>Identificador de Secuencia</b>	<b>Secuencia</b>
Región proteica		<b>12345678901234567890</b>
		DIQMTQSPSSVSASVGDRV ITCRASQGISSWLAWYQQK GKAPKLLIYEASNLETGVPS RFSGSGSGSDFTLTISSLQ EDFATYYCQQTSSFLSFGG GTKVEHKK
<b>ENLAZADOR</b>	<b>SEQ ID NO:36</b>	<b>TVAAPSVFIFPP</b>
<b>E26.13 VL</b>	<b>SEQ ID NO:238</b>	DIQMTQSPSSLSASVGDRV ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYFTISSLQ EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLQITR
<b>CL</b>	<b>SEQ ID NO:5</b>	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS
		<b>FNRGEC</b>
<b>E26.35-SS-X3 JM DVD-Ig PESADA VARIABLE</b>	<b>SEQ ID NO:226</b>	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSRDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCARGG VYKGYFDVWGQGPVTVSSA STKGPQVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCTASGFTFSMFGVH WVRQAPGKGLEWVAAVSYDG SNKYAESVKGRFTISRDN KNILFLQMDSLRLEDTAVYY CARGRPKVVIAPLAHWGQG TLVTVSS
<b>E26.35 VH</b>	<b>SEQ ID NO:208</b>	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSRDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCARGG VYKGYFDVWGQGPVTVSS
<b>ENLAZADOR</b>	<b>SEQ ID NO:33</b>	<b>ASTKGP</b>
<b>X3 JM VH</b>	<b>SEQ ID NO:227</b>	



<b>Proteína</b>	<b>Identificador de Secuencia</b>	<b>Secuencia</b>
Región proteica		<b>12345678901234567890</b>
		QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCTASGFTFSMFGVHWVRQA PGKGLEWVAAVSYDGSNKYY AESVKGRFTISRDNKNI LF LQMDSLRLEDTAVYYCARGR PKVVIPAPLAHWGQGTLLVTV SS
<b>CH</b>	<b>SEQ ID NO:214</b>	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYITLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK
<b>E26.35-SS-X3 JM DVD-Ig LIGERA</b>	<b>SEQ ID NO:228</b>	DIQMTQSPSSLSASVGDRV ITCRASGNIHNYLTWYQQTP
<b>VARIABLE</b>		GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYFTISSLQ EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLQITRTVAAPDIQMTQ PSSVSASVGDRVITCRASQ GISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYEASNLETGVPSRFSGSGS GSDFTLTISSLQPEDFATYY CQQTSSFLLSFGGGTKVEIK R
<b>E26.35 VL</b>	<b>SEQ ID NO:239</b>	DIQMTQSPSSLSASVGDRV ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYFTISSLQ EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLQITR
<b>ENLAZADOR</b>	<b>SEQ ID NO:35</b>	<b>TVAAP</b>
<b>X3 JM VL</b>	<b>SEQ ID NO:229</b>	

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia
Región proteica		12345678901234567890
		DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISSWLAWYQQK GKAPKLLIYEASNLETGVPS RFSGSGSGSDFTLTISLQ EDFATYYCQQTSSFLSFGG GTKVEIKR
CL	SEQ ID NO:5	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
E26.13 JM-SS-X3 DVD-Ig PESADA VARIABLE	SEQ ID NO:230	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSRDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCARGG VTKGYFDVWGQTTVTVSSA STKGPQVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCTASGFTFSMFGVH WVRQAPGKGLEWVAAVSYDG SNKYAESVKGRFTISRDN KNILFLQMDSLRLEDTAVYY CARGRPKVVIPAPLAHWGQG TLVTFSS
E26.13 JM VH	SEQ ID NO:206	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSRDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCARGG VTKGYFDVWGQTTVTVSS
ENLAZADOR	SEQ ID NO:33	ASTKGP
X3 VH	SEQ ID NO:213	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL
		SCTASGFTFSMFGVHWVRQA PGKGLEWVAAVSYDGSNKYY AESVKGRFTISRDNKNTLF LQMDSLRLEDTAVYYCARGR PKVVIPAPLAHWGQGTLVTF SS
CH	SEQ ID NO:214	

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia
Región proteica		12345678901234567890
		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHNKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPPV LDSDGSFFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCSCVMHEALHNNHYT QKSLSLSPGK
<b>E26.13 JM-SS-X3 DVD-Ig LIGERA VARIABLE</b>	<b>SEQ ID NO:231</b>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYFTFTISLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ <u>GTKLEIKRTVAAP</u> DIQMTQS PSSVSASVGDRVTITCRASQ GISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYEASNLETGVPSRFSGSGS GSDFTLTISLQPEDFATYY CQQTSSFLLSFGGGTKVEHK R
<b>E26.13 JM VL</b>	<b>SEQ ID NO:207</b>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYFTFTISLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLEIKR
<b>ENLAZADOR</b>	<b>SEQ ID NO:35</b>	<b>TVAAP</b>
<b>X3 VL</b>	<b>SEQ ID NO:216</b>	DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISSWLAWYQQKP GKAPKLLIYEASNLETGVPS RFSGSGSGSDFTLTISLQPE EDFATYYCQQTSSFLLSFGG GTKVEHKR
<b>CL</b>	<b>SEQ ID NO:5</b>	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNFFYPREAKVQW

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia
Región proteica		12345678901234567890
		KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
<b>E26.35-SS-X3 DVD-Ig PESADA VARIABLE</b>	<b>SEQ ID NO:232</b>	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSRDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCARGG VYKGYFDVWGQGPVTVSSA STKGPQVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCTASGFTFSMFGVH WVRQAPGKGLEWVAAVSYDG SNKYAESVKGRFTISRDN KNILFLQMDSLRLEDTAVYY CARGRPKVVIPAPLAHWGQG TLVTFSS
<b>E26.35 VH</b>	<b>SEQ ID NO:208</b>	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSRDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCARGG VYKGYFDVWGQGPVTVSS
<b>ENLAZADOR</b>	<b>SEQ ID NO:33</b>	<b>ASTKGP</b>
<b>X3 VH</b>	<b>SEQ ID NO:213</b>	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCTASGFTFSMFGVHWVRQA PGKGLEWVAAVSYDGSNKYY AESVKGRFTISRDNKNTLF LQMDSLRLEDTAVYYCARGR PKVVIPAPLAHWGQGLVTF SS
<b>CH</b>	<b>SEQ ID NO:214</b>	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTIVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTQVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia
Región proteica		12345678901234567890
<b>E26.35-SS-X3 DVD-Ig LIGERA</b>	<b>SEQ ID NO:233</b>	DIQMTQSPSSLSASVGDRV ITCRASGNIHNYLTWYQQTP
<b>VARIABLE</b>		GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYFTISSLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTLQITRTVAAPDIQMTQS PSSVSASVGDRVITCRASQ GISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYEASNLETGVPSRFSGSGS GSDFTLTISSLQPEDFATYY CQQTSSFLLSFGGGTKVEHK R
<b>E26.35 VL</b>	<b>SEQ ID NO:239</b>	DIQMTQSPSSLSASVGDRV ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYFTISSLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTLQITR
<b>ENLAZADOR</b>	<b>SEQ ID NO:35</b>	<b>TVAAP</b>
<b>X3 VL</b>	<b>SEQ ID NO:216</b>	DIQMTQSPSSVSASVGDRV ITCRASQGISSWLAWYQQK GKAPKLLIYEASNLETGVPS RFSGSGSGSDFTLTISSLQP EDFATYYCQQTSSFLLSFGG GTKVEHKR
<b>CL</b>	<b>SEQ ID NO:5</b>	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
<b>E26.13-SS-X3 JM DVD-Ig PESADA VARIABLE</b>	<b>SEQ ID NO:234</b>	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSRDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCARGG VTKGYFDVWGQGPVTVSSA <u>STKGPQVQLVESGGGVVQPG</u> RSLRLSCTASGFTFSMFGVH WVRQAPGKGLEWVAAVSYDG SNKYAESVKGRFTISRDN KNILFLQMDSLRLEDTAVYY CARGRPKVVIPAPLAHWGQG TLTVSS

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia
Región proteica		12345678901234567890
<b>E26.13 VH</b>	<b>SEQ ID NO:204</b>	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSRYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTY PDSVKGRFTISRDNKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCARGG VIKGYFDVWGQGPVTVSS
<b>ENLAZADOR</b>	<b>SEQ ID NO:33</b>	<b>ASTKGP</b>
<b>X3 JM VH</b>	<b>SEQ ID NO:227</b>	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL
		SCTASGFTFSMFGVHWVRQA PGKGLEWVAAVSYDGSNKYY AESVKGRFTISRDNKNTLF LQMDSLRLEDTAVYYCARGR PKVVIPAPLAHWGQGLVTV SS
<b>CH</b>	<b>SEQ ID NO:214</b>	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMI SRTP EVTQVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCSSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
<b>E26.13-SS-X3 JM Anti-IL-1alfa/beta DVD-Ig LIGERA VARIABLE</b>	<b>SEQ ID NO:235</b>	DIQMTQSPSSLSASVGRVT ITCRASGNIHNYLTWYQQT GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYFTISSLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTLQITRTVAAPDIQMTQS PSSVSASVGRVTITCRASQ GISSWLAWYQKPKAPKLL IYEASNLETGVPSRFSGSGS GSDFTLTISLQPEDFATYY CQQTSSFLLSFGGGTKVEIK R
<b>E26.13 VL</b>	<b>SEQ ID NO:238</b>	

<b>Proteína</b>	<b>Identificador de Secuencia</b>	<b>Secuencia</b>
Región proteica		<b>12345678901234567890</b>
		DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYFTISSLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLQITR
<b>ENLAZADOR</b>	<b>SEQ ID NO:35</b>	<b>TVAAP</b>
<b>X3 JM VL</b>	<b>SEQ ID NO:229</b>	DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISSWLAWYQQKP GKAPKLLIYEASNLETGVPS RFSGSGSGSDFTLTISLQP EDFATYYCQQTSSFLLSFGG GTKVEIKR
<b>CL</b>	<b>SEQ ID NO:5</b>	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW
		KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDYSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
<b>E26.13 JM-LL-X3 DVD-Ig PESADA VARIABLE</b>	<b>SEQ ID NO:236</b>	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSRIDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCARGG VTKGYFDVWGQGTITVTVSSA STKGPSVFPLAPQVQLVESG GGVVQPGRSLRLSCTASGFT FSMFVGHVWRQAPGKLEWV AAVSYDGSNKYYAESVKGRF TISRDNKNI LFLQMDSLRL EDTAVYYCARGRPKVVIPAP LAHWGQGTLVTFSS
<b>E26.13 JM VH</b>	<b>SEQ ID NO:206</b>	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSRIDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCARGG VTKGYFDVWGQGTITVTVSS
<b>ENLAZADOR</b>	<b>SEQ ID NO:34</b>	<b>ASTKGPSVFPLAP</b>
<b>X3 VH</b>	<b>SEQ ID NO:213</b>	

<b>Proteína</b>	<b>Identificador de Secuencia</b>	<b>Secuencia</b>
Región proteica		<b>12345678901234567890</b>
		QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCTASGFTFSMFGVHWVRQA PGKGLEWVAAVSYDGSNKYY AESVKGRFTISRDNKNI LF LQMDSLRLEDTAVYYCARGR PKVVIPAPLAHWGQGTLVTF SS
<b>CH</b>	<b>SEQ ID NO:214</b>	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLICLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
<b>E26.13 JM-LL-X3 DVD-Ig LIGERA</b>	<b>SEQ ID NO:237</b>	DIQMTQSPSSLSASVGDRV ITCRASGNIHNYLTWYQQTP
<b>VARIABLE</b>		GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYFTISLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLEIKRTVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSVSASVGDRV ITCRASQGISSWLAWYQQKP GKAPKLLIYEASNLETGVPS RFSGSGSGSDFTLTISLQP EDFATYYCQQTSSFLSFGG GTKVEHKR
<b>E26.13 JM VL</b>	<b>SEQ ID NO:207</b>	DIQMTQSPSSLSASVGDRV ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYFTISLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLEIKR
<b>ENLAZADOR</b>	<b>SEQ ID NO:36</b>	<b>TVAAPSVFIFPP</b>
<b>X3 VL</b>	<b>SEQ ID NO:216</b>	



Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia
Región proteica		<u>1234567890</u> 1234567890
		DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISSWLAWYQQKPK GKAPKLLIYEASNLETGVPS RFSGSGSGSDFTLTISLQF EDFATYYCQQTSSFLSFSGG GTKVEHKR
<b>CL</b>	<b>SEQ ID NO:5</b>	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

Las secuencias enlazadoras se indican como residuos subrayados.

**Ejemplo 4: Caracterización funcional de proteínas IL-1 $\alpha$ / $\beta$  DVD-Ig**

**Ejemplo 4.1: Protocolo de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas de IL-1 $\alpha$ / $\beta$**

Las proteínas de unión IL-1 $\beta$ / $\alpha$  DVD-Ig que se unen a IL-1 $\beta$  e IL-1 $\alpha$  se determinaron mediante ELISA (ensayo descrito anteriormente, Ejemplo 2.1). Los resultados se muestran en la Tabla 15.

5

**Tabla 15. Unión de proteínas IL-1 $\alpha$ / $\beta$  DVD-Ig a IL-1 $\alpha$  o IL-1 $\beta$  humana mediante ELISA**

AcMo	CE50 en ELISA de hIL-1 $\beta$ (pM)	CE50 en ELISA de hIL-1 $\alpha$ (pM)
E26.13-LL-X3	8,1	5,8
E26.13-SS-X3	7,5	6,4
E26.13-SS-X3 JM	6,9	4,3
E26.35-SS-X3	8	6,2
E26.35-SS-X3 JM	6,3	4,0
X3-SS-E26.13	70	4,5

**Ejemplo 4.2: Bioensayo de IL-1 $\alpha$ / $\beta$  y ensayo de neutralización**

Células MRC5 se extendieron en placas a 1,5-2 x 10<sup>4</sup> células por pocillo en un volumen de 100  $\mu$ l y se incubaron durante una noche a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Se preparó una solución madre de trabajo 20  $\mu$ g/ml de DVD-Ig (concentrada 4x) en medio MEM completo. Se realizó una dilución en serie de ocho puntos (5  $\mu$ g/ml-0,0003  $\mu$ g/ml) en MEM completo en placas de dilución Marsh. Se añadieron sesenta y cinco  $\mu$ l/pocillo de cada dilución de anticuerpo por cuadruplicado a una placa de 96 pocillos de fondo en v (Costar n° 3894) y 65  $\mu$ l de una solución 200 pg/ml de IL-1 $\alpha$  o IL-1 $\beta$  o 65  $\mu$ l de una solución mixta que contenía una solución 50 pg/ml de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Los pocillos de control recibieron 65  $\mu$ l de 200 pg/ml de IL-1 $\alpha$  o IL-1 $\beta$  o 50 pg/mL de IL-1 $\alpha$ / $\beta$  mezclada (concentrada 4x), más 65  $\mu$ l de medio MEM y los pocillos de control del medio recibieron 130  $\mu$ l de medio. Después de 1 hora de incubación, se añadieron 100  $\mu$ l de la mezcla de DVD-Ig/Ag a las células MRC5. Todos los volúmenes de los pocillos eran igual a 200  $\mu$ l. Todos los reactivos de la placa se concentraron entonces 1x. Después de una incubación durante 16-20 horas, los contenidos de los pocillos (150  $\mu$ l) se transfirieron a una placa de 96 pocillos de fondo redondo (Costar n° 3799) y se colocaron en un congelador a -20°C. En el material sobrenadante se sometieron a ensayo los niveles de hIL-8 mediante el uso de un kit de ELISA para IL-8 humana (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota) o MSD hIL-8 (kit de quimioluminiscencia). La potencia de la neutralización se determinó calculando el porcentaje de inhibición con respecto a IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o el valor de control solo de IL-1 $\alpha$ / $\beta$  (Tabla 16).

15

25

**Tabla 16. Potencia de moléculas IL-1 $\alpha$ / $\beta$  DVD-Ig en IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  humana e IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  de mono Cynomolgus**

IL-1 $\alpha$ / $\beta$ DVD-Ig	Potencia (pM)
--------------------------------	---------------

	hIL-1 $\beta$	hIL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$ cyno	IL-1 $\alpha$ cyno
E26.13-LL-X3	18,3	10,2	16,7	1053
E26.13-SS-X3	16,0	16,2	8,4	955
E26.13-SS-X3 JM	28,3	26,5	17,6	1880
E26.35-SS-X3	1,8	25,8	0,6	474
X3-LL-E26.13	1470	8,9	ND	ND
X3-SS-E26.13	2676	7,6	ND	ND

ND: No determinada.

#### Ejemplo 4.3: Medición de la afinidad de moléculas IL-1 $\alpha/\beta$ DVD-Ig

La unión de IL-1 $\alpha/\beta$  DVD-Igs a IL-1 $\beta$  e IL-1 $\alpha$  humanas recombinantes purificadas e IL-1 $\beta$  e IL-1 $\alpha$  de mono cynomolgus se determinó usando resonancia de plasmón superficial como se ha descrito en el Ejemplo 2.3 y los resultados se muestran en la Tabla 17.

5

**Tabla 17. Medición de la afinidad de moléculas IL-1 $\alpha/\beta$  DVD-Ig**

	IL-1 $\beta$ humana	IL-1 $\alpha$ humana	IL-1 $\beta$ cyno	IL-1 $\alpha$ cyno
<b>E26.13-LL-X3</b>	<b>7,82 x 10<sup>-12</sup></b>	<b>6,15 x 10<sup>-12</sup></b>	<b>1,24 x 10<sup>-11</sup></b>	<b>3,24 x 10<sup>-9</sup></b>
Kon (1/Ms)	1,45 x 10 <sup>6</sup>	6,46 x 10 <sup>5</sup>	1,74 x 10 <sup>6</sup>	3,15 x 10 <sup>5</sup>
Koff (1/s)	1,13 x 10 <sup>-5</sup>	3,9 x 10 <sup>-6</sup>	2,16 x 10 <sup>-5</sup>	1,05 x 10 <sup>-3</sup>
<b>E26.13-SS-X3</b>	<b>2,06 x 10<sup>-11</sup></b>	<b>7,61 x 10<sup>-12</sup></b>	<b>1,53 x 10<sup>-11</sup></b>	<b>4,11 x 10<sup>-9</sup></b>
Kon (1/Ms)	1,77 x 10 <sup>6</sup>	1,98 x 10 <sup>5</sup>	1,45 x 10 <sup>6</sup>	6,37 x 10 <sup>4</sup>
Koff (1/s)	3,61 x 10 <sup>-5</sup>	1,5 x 10 <sup>-6</sup>	2,22 x 10 <sup>-5</sup>	2,61 x 10 <sup>-4</sup>
<b>E26.35-SS-X3</b>	<b>5,03 x 10<sup>-12</sup></b>	<b>1,33 x 10<sup>-11</sup></b>	<b>1,06 x 10<sup>-11</sup></b>	<b>3,27 x 10<sup>-9</sup></b>
Kon (1/Ms)	1,32 x 10 <sup>6</sup>	1,62 x 10 <sup>5</sup>	1,84 x 10 <sup>6</sup>	7,24 x 10 <sup>4</sup>
Koff (1/s)	6,81 x 10 <sup>-6</sup>	2,14 x 10 <sup>-6</sup>	1,94 x 10 <sup>-5</sup>	2,36 x 10 <sup>-4</sup>

La presente invención se refiere a técnicas bien conocidas en el campo de la biología molecular y de la administración de fármacos. Estas técnicas incluyen, pero no se limitan a las técnicas descritas en las siguientes publicaciones: Ausubel et al. (compiladores), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Ausubel, F. M. et al. compiladores, *Short Protocols In Molecular Biology* (4<sup>a</sup> ed. 1999) John Wiley & Sons, NY. (ISBN 0-471-32938-X). *Controlled Drug Bioavailability Drug Product Design and Performance*, Smolen y Ball (compiladores), Wiley, New York (1984); Giegé et al., capítulo 1, *En Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, A Practical Approach*, 2<sup>a</sup> ed., (Ducruix y Giegé, compiladores) (Oxford University Press, New York, 1999) pp. 1-16; Goodson, J.M., capítulo 6, *En Medical Applications of Controlled Release*, vol. II. *Applications and Evaluation*, (Langer y Wise, compiladores) (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1984), pp. 115-138; Hammerling et al., compiladores, "Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas", *En Research Monographs in Immunology*, vol. 3 (J.L. Turk, Editor general) (Elsevier, New York, 1981), pp. 563-587; Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2<sup>a</sup> ed. 1988); Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987); Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication n° 91-3242; Kontermann y Dübel, compiladores, *Antibody Engineering* (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); Lu y Weiner compiladores, *Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysis* (2001) BioTechniques Press. Westborough, Mass. 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X); Goodson, J.M., *Medical Applications of Controlled Release*, (Langer y Wise, compiladores) (CRC Press, Boca Raton, 1974); Old y Primrose, *Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering* (3<sup>a</sup> ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston; *Studies in Microbiology*, V.2:409 pp. (ISBN 0-632-01318-4); Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2<sup>a</sup> ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3 (ISBN 0-87969-309-6); *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, (J.R. Robinson, compilador) (Marcel Dekker, Inc., New York, 1978); Winnacker, E.L. *From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology* (1987) VCH Publishers, N.Y. (traducido por Horst Ibelgauffs), 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4).

10

15

20

25

30

La puesta en práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de inmunología, biología molecular y biología celular, que son bien conocidas en la técnica.

**Equivalentes**

5 La invención se puede realizar con otras formas específicas sin apartarse de las características esenciales de la misma. Las realizaciones anteriores se deben considerar, por lo tanto, en todos los aspectos ilustrativas y no limitativas de la invención descrita en el presente documento. El alcance de la invención está indicado de este modo por las reivindicaciones adjuntas más que por la descripción anterior y todos los cambios que entran dentro del significado y el grado de equivalencia de las reivindicaciones, se entiende que están incluidos en el presente documento.

10 **LISTA DE SECUENCIAS**

<110> ABBOTT LABORATORIES

<120> PROTEÍNAS DE UNIÓN A IL-1

<130> ABT-121.2PCT (10489WOO1)

15 <140> PCT/US11/36444

< 141> 2011-05-13

<150> 61/425,701

< 151> 2010-12-21

<150> 61/334,917

< 151> 2010-05-14

20 <160> 381

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

< 211> 159

< 212> PRT

25 < 213> Homo sapiens

ES 2 635 594 T3

<400> 1

Ser Ala Pro Phe Ser Phe Leu Ser Asn Val Lys Tyr Asn Phe Met Arg  
 1 5 10 15

Ile Ile Lys Tyr Glu Phe Ile Leu Asn Asp Ala Leu Asn Gln Ser Ile  
 20 25 30

Ile Arg Ala Asn Asp Gln Tyr Leu Thr Ala Ala Ala Leu His Asn Leu  
 35 40 45

Asp Glu Ala Val Lys Phe Asp Met Gly Ala Tyr Lys Ser Ser Lys Asp  
 50 55 60

Asp Ala Lys Ile Thr Val Ile Leu Arg Ile Ser Lys Thr Gln Leu Tyr  
 65 70 75 80

Val Thr Ala Gln Asp Glu Asp Gln Pro Val Leu Leu Lys Glu Met Pro  
 85 90 95

Glu Ile Pro Lys Thr Ile Thr Gly Ser Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe  
 100 105 110

Trp Glu Thr His Gly Thr Lys Asn Tyr Phe Thr Ser Val Ala His Pro  
 115 120 125

Asn Leu Phe Ile Ala Thr Lys Gln Asp Tyr Trp Val Cys Leu Ala Gly  
 130 135 140

Gly Pro Pro Ser Ile Thr Asp Phe Gln Ile Leu Glu Asn Gln Ala  
 145 150 155

<210> 2

<211> 153

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

ES 2 635 594 T3

<400> 2

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

<210> 3

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Phe Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

5

ES 2 635 594 T3

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

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

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325 330

<210> 4  
<211> 330

ES 2 635 594 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

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

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

ES 2 635 594 T3

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

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

5

<400> 5  
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 1 5 10 15

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

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

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 100 105

<210> 6  
 <211> 105  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10



ES 2 635 594 T3

<400> 6

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

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val  
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu  
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
100 105

<210> 7

< 211> 30

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

5

<400> 7

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser  
20 25 30

<210> 8

< 211> 14

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

10

<400> 8

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala  
1 5 10

15

<210> 9

< 211> 32

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 9

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln  
1 5 10 15

20

Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg  
20 25 30

<210> 10

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

ES 2 635 594 T3

<400> 10  
 Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

5  
 <210> 11  
 < 211> 4  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

10  
 <220>  
 < 221> MOD\_RES  
 < 222> (3)..(3)  
 < 223> Cualquier aminoácido

<400> 11  
 Phe Gly Xaa Gly  
 1

15  
 <210> 12  
 < 211> 9  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

20  
 <220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>  
 < 221> MOD\_RES  
 < 222> (2) .. (9)  
 < 223> Cualquier aminoácido

25  
 <400> 12  
 Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

30  
 <210> 13  
 < 211> 23  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 13  
 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  
 20

35  
 <210> 14  
 < 211> 15  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 14  
 Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

40  
 <210> 15  
 < 211> 32

ES 2 635 594 T3

< 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 15  
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr  
 1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

5 <210> 16  
 < 211> 10  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

10 <400> 16  
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
 1 5 10

<210> 17  
 < 211> 5  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

15 <400> 17  
 Ser Tyr Asp Met Ser  
 1 5

20 <210> 18  
 < 211> 17  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 18  
 Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

25 <210> 19  
 < 211> 10  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 19  
 Gly Gly Val Thr Lys Gly Tyr Phe Asp Val  
 1 5 10

30 <210> 20  
 < 211> 11  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 20  
 Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu Thr  
 1 5 10

35 <210> 21  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

ES 2 635 594 T3

<400> 21  
**Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp**  
 1 5

5 <210> 22  
 < 211> 9  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 22  
**Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr Thr**  
 1 5

10 <210> 23  
 < 211> 5  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15 <400> 23  
**Leu Glu Trp Ile Gly**  
 1 5

20 <210> 24  
 < 211> 4  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25 <220>  
 < 221> MOD\_RES  
 < 222> (3)..(3)  
 < 223> Cualquier aminoácido

<400> 24  
**Trp Gly Xaa Gly**  
 1

30 <210> 25  
 < 211> 23  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 25  
**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**  
 20

35 <210> 26  
 < 211> 6  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

40 <220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 26  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 1 5

5  
 <210> 27  
 < 211> 5  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

10  
 <400> 27  
 Gly Gly Ser Gly Gly  
 1 5

<210> 28  
 < 211> 10  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

15  
 <220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 28  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10

20  
 <210> 29  
 < 211> 10  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25  
 <400> 29  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser  
 1 5 10

<210> 30  
 < 211> 13  
 < 212> PRT  
 30 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 30  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10

35  
 <210> 31  
 < 211> 14  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

40  
 <220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 31  
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
1 5 10

5  
<210> 32  
< 211> 15  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 32  
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5 10 15

10  
<210> 33  
< 211> 6  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

15  
<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 33  
Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
1 5

20  
<210> 34  
< 211> 13  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25  
<400> 34  
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro  
1 5 10

30  
<210> 35  
< 211> 5  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 35  
Thr Val Ala Ala Pro  
1 5

35  
<210> 36  
< 211> 12  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

40  
<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 36  
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro  
1 5 10

5  
<210> 37  
< 211> 16  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

10  
<400> 37  
Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg  
1 5 10 15

<210> 38  
< 211> 17  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

15  
<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 38  
Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg  
1 5 10 15

Val

20  
<210> 39  
< 211> 9  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25  
<400> 39  
Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly  
1 5

<210> 40  
< 211> 10  
< 212> PRT  
30 < 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 40  
Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly  
1 5 10

35  
<210> 41  
< 211> 6  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

40  
<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 41  
**Ser Ala Lys Thr Thr Pro**  
 1 5

5  
 <210> 42  
 < 211> 6  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

10  
 <400> 42  
**Arg Ala Asp Ala Ala Pro**  
 1 5

<210> 43  
 < 211> 9  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

15  
 <220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 43  
**Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser**  
 1 5

20  
 <210> 44  
 < 211> 12  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25  
 <400> 44  
**Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ser**  
 1 5 10

30  
 <210> 45  
 < 211> 27  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 45  
**Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly**  
 1 5 10 15

**Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser**  
 20 25

35  
 <210> 46  
 < 211> 18  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial



ES 2 635 594 T3

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 46  
 Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala  
 1 5 10 15  
 Arg Val

<210> 47  
 < 211> 5  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 47  
 Ala Asp Ala Ala Pro  
 1 5

<210> 48  
 < 211> 12  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 48  
 Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro  
 1 5 10

<210> 49  
 < 211> 6  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 49  
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro  
 1 5

<210> 50  
 < 211> 13  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 50  
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro  
 1 5 10

<210> 51  
 < 211> 6  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

# ES 2 635 594 T3

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 51  
Ala Lys Thr Thr Pro Pro  
1 5

5 <210> 52  
< 211> 13  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

10 <220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 52  
Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Thr Pro Leu Ala Pro  
1 5 10

15 <210> 53  
< 211> 6  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20 <400> 53  
Ala Lys Thr Thr Ala Pro  
1 5

<210> 54  
< 211> 13  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

25 <220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 54  
Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro  
1 5 10

30 <210> 55  
< 211> 15  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

35 <400> 55  
Gly Glu Asn Lys Val Glu Tyr Ala Pro Ala Leu Met Ala Leu Ser  
1 5 10 15

<210> 56  
< 211> 15  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

40

ES 2 635 594 T3

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 56

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

5

<210> 57

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

10

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 57

Gly His Glu Ala Ala Val Met Gln Val Gln Tyr Pro Ala Ser  
1 5 10 15

15

<210> 58

< 211> 119

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 58

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

20

Ala Arg Gly Gly Val Thr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

25

<210> 59

< 211> 107

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 59

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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

<210> 60

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 60

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 61

<211> 119

5

10

< 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

5

<400> 61  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30  
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 62  
 < 211> 119  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

10

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 62

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 63

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 63

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

5

10

ES 2 635 594 T3

<210> 64  
< 211> 119  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

5

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 64  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30  
Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
85 90 95  
Ala Arg Gly Gly Val Thr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110  
Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

10

<210> 65  
< 211> 119  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 65

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Val Thr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 66

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 66

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Val Thr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

5

10



ES 2 635 594 T3

<210> 67  
< 211> 119  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

5

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 67  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30  
Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110  
Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

10

<210> 68  
< 211> 119  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 68

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 69

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 69

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

5

10

ES 2 635 594 T3

<210> 70  
 < 211> 119  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

5

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

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

10

<210> 71  
 < 211> 119  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

15

<400> 71  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

ES 2 635 594 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 72

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 72

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 73

<211> 119

10

ES 2 635 594 T3

< 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

5

<400> 73  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30  
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 74  
 < 211> 119  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

10

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 74  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30

ES 2 635 594 T3

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 75  
< 211> 119  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

5

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 75  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

10

<210> 76  
< 211> 119  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

ES 2 635 594 T3

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 76

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

5

<210> 77

< 211> 119

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

10

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 77

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

ES 2 635 594 T3

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

5

<210> 78  
< 211> 119  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 78  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

10

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 79  
< 211> 119  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

15

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético



ES 2 635 594 T3

<400> 79

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 80

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 80

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

5

10

ES 2 635 594 T3

<210> 81  
 < 211> 119  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

5

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 81  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30  
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
 115

10

<210> 82  
 < 211> 119  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 82

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 83

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 83

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

5

10

ES 2 635 594 T3

<210> 84  
< 211> 119  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

5

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 84  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30  
Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
85 90 95  
Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110  
Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

10

<210> 85  
< 211> 119  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

15

<400> 85  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg



ES 2 635 594 T3

<210> 87  
 < 211> 119  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

5

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 87  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
 20 25 30  
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Met Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
 115

10

<210> 88  
 < 211> 119  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

15

<400> 88  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr

ES 2 635 594 T3

20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 89  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 89  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

10

<210> 90  
 <211> 119

ES 2 635 594 T3

< 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

5

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

<210> 91  
 < 211> 119  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

10

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 91  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30  
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val



ES 2 635 594 T3

35

40

45

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 92

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 92

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Val Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Gln Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

10

<210> 93

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 635 594 T3

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 93

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

5

<210> 94

< 211> 119

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

10

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 94

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

ES 2 635 594 T3

50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 95  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 95  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Gly Ser  
115

10

<210> 96  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 96

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 97

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 97

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

10

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe

# ES 2 635 594 T3

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

5  
 <210> 98  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 98		10		15											
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Gly	Gly	Gly	Asp	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ser	Ala	Ser	Gly	Phe	Ile	Phe	Ser	Lys	Tyr
			20					25					30		
Asp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Tyr	Ile	Ser	His	Gly	Gly	Ala	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Phe
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asp	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Gly	Gly	Val	Tyr	Lys	Gly	Tyr	Phe	Asp	Glu	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115												

10  
 <210> 99  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 99

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 100

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 100

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

5

10

ES 2 635 594 T3

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

5

<210> 101  
< 211> 119  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 101  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

10

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 102  
< 211> 119  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

15

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 102  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

ES 2 635 594 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 103

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 103

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

5

10



ES 2 635 594 T3

<210> 104  
 < 211> 119  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

5

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 104  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30  
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
 115

10

<210> 105  
 < 211> 119  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

15

<400> 105  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30

ES 2 635 594 T3

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

Ala Tyr Val Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 106

< 211> 119

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

5

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 106

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

10

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 107

< 211> 119

ES 2 635 594 T3

< 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

5

<400> 107  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30  
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 108  
 < 211> 119  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

10

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 108  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30  
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

ES 2 635 594 T3

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 109

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 109

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

Ser Leu Arg Leu Gly Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

10

<210> 110

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

15

ES 2 635 594 T3

<400> 110

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 111

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 111

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

5

10

ES 2 635 594 T3

<210> 112  
 < 211> 119  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

5

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 112  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30  
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
 115

10

<210> 113  
 < 211> 119  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 113

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Ala  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 114

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 114

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

5

10

ES 2 635 594 T3

<210> 115  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

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

10

<210> 116  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético



ES 2 635 594 T3

<400> 116

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 117

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 117

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

5

10

ES 2 635 594 T3

<210> 118  
< 211> 119  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

5

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 118  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30  
Asp Met Ser Trp Val His Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90  
Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110  
Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

10

<210> 119  
< 211> 119  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

15

<400> 119  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

ES 2 635 594 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 120

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 120

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 121

<211> 119

5

10

ES 2 635 594 T3

< 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

5

<400> 121  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
 20 25 30  
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Gln Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 122  
 < 211> 119  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

10

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 122  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
 20 25 30

ES 2 635 594 T3

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 123

< 211> 119

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

5

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 123

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Val Thr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

10

<210> 124

< 211> 119

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

ES 2 635 594 T3

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 124

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

5

<210> 125

< 211> 119

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

10

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 125

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

ES 2 635 594 T3

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Leu  
115

5

<210> 126  
< 211> 119  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 126  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Val Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

10

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 127  
< 211> 119  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

15

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 127

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 128

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 128

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

5

10



ES 2 635 594 T3

<210> 129  
< 211> 119  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

5

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 129  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30  
Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110  
Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

10

<210> 130  
< 211> 119  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 130

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 131

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 131

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr His Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

5

10

ES 2 635 594 T3

<210> 132  
< 211> 119  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

5

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 132  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30  
Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110  
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

10

<210> 133  
< 211> 119  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 133

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Gly His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 134

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 134

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

5

10

ES 2 635 594 T3

<210> 135  
 < 211> 119  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

5

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

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

10

<210> 136  
 < 211> 119  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

15

<400> 136  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

ES 2 635 594 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 137

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 137

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 138

<211> 119

10

ES 2 635 594 T3

< 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

5

<400> 138  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30  
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 139  
 < 211> 119  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

10

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 139  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30

ES 2 635 594 T3

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 140  
< 211> 119  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

5

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 140  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Cys Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

10

<210> 141  
< 211> 119  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial



ES 2 635 594 T3

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 141

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

5

<210> 142

< 211> 119

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

10

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 142

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

ES 2 635 594 T3

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

5

<210> 143  
< 211> 119  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 143  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

10

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 144  
< 211> 119  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

15

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 144

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 145

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 145

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

5

10

ES 2 635 594 T3

<210> 146  
 < 211> 119  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

5

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 146  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
 20 25 30  
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
 115

10

<210> 147  
 < 211> 119  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 147

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 148

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 148

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

5

10

ES 2 635 594 T3

<210> 149  
 < 211> 107  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

5

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 149  
 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Gly Trp  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Gln Ala Lys Thr Leu Met Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Asn Ile Pro Ala  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
 100 105

10

<210> 150  
 < 211> 107  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

15

<400> 150  
 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Thr Tyr

ES 2 635 594 T3

20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Thr Leu Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

5

<210> 151  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 151  
Gly 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Gln Tyr  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Lys Leu Pro Tyr  
85 90 95

10

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

<210> 152  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 152

Gly 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Gln Tyr  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Lys Leu Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

<210> 153

< 211> 107

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

5

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 153

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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Glu Tyr  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Lys Leu Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

<210> 154

< 211> 107

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

15



ES 2 635 594 T3

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 154

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

5

<210> 155

< 211> 107

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

10

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 155

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

15

<210> 156

< 211> 107

ES 2 635 594 T3

< 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

5

<400> 156  
 Gly 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr His Tyr  
 20 25 30  
 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asp Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Ser Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Leu Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
 100 105

<210> 157  
 < 211> 107  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

10

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 157

Gly 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr His Tyr  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Leu Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

<210> 158

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 158

Gly 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr His Tyr  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Leu Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

10

<210> 159

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 635 594 T3

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 159

Gly 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Thr Leu Pro Tyr  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
 100 105

5

<210> 160

< 211> 107

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

10

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 160

Gly 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Thr Leu Pro Tyr  
 85 90 95

Ile Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
 100 105

15

<210> 161

< 211> 107

ES 2 635 594 T3

< 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

5 <400> 161  
 Gly 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Thr Tyr  
 20 25 30  
 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Thr Leu Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
 100 105

<210> 162  
 < 211> 107  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

10 <220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

15 <400> 162  
 Gly 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Gln Tyr  
 20 25 30  
 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Thr Leu Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
 100 105

ES 2 635 594 T3

<210> 163  
 < 211> 107  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

5

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 163  
 Gly 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Thr Leu Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
 100 105

10

<210> 164  
 < 211> 107  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 164

Gly 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Asp Tyr  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Thr Leu Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

<210> 165

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 165

Gly 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Asp Tyr  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Leu Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

<210> 166

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

15

ES 2 635 594 T3

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 166

```

Gly 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Asn Tyr
          20          25          30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35          40          45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Lys Leu Pro Tyr
          85          90          95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr
          100          105
    
```

5

<210> 167

< 211> 107

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

10

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 167

```

Gly 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Lys Tyr
          20          25          30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35          40          45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Arg Leu Pro Tyr
          85          90          95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr
          100          105
    
```



ES 2 635 594 T3

<210> 168  
< 211> 107  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

5

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 168  
Gly 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Lys Tyr  
20 25 30  
Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45  
Tyr Asp Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
Ser Ser Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80  
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Arg Leu Pro Tyr  
85 90 95  
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

10

<210> 169  
< 211> 107  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 169

Gly 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr His Tyr  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Leu Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

<210> 170

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 170

Gly 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr His Tyr  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Leu Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr

100

105

<210> 171

<211> 107

5

10

ES 2 635 594 T3

< 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

5

<400> 171  
 Gly 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Gln Tyr  
 20 25 30  
 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asp Ala Lys Ile Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Ser Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Lys Leu Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
 100 105

<210> 172  
 < 211> 107  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

10

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 172  
 Gly 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr His Tyr  
 20 25 30  
 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asp Ala Lys Ile Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Ser Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Lys Leu Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
 100 105

15

ES 2 635 594 T3

<210> 173  
 < 211> 107  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

5

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 173  
 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Gly Trp  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Gln Ala Lys Thr Leu Met Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Asn Ile Pro Ala  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
 100 105

10

<210> 174  
 < 211> 107  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

15

<400> 174  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

ES 2 635 594 T3

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Thr Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Arg Leu Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

<210> 175  
< 211> 107  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

5

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 175  
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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Thr Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Arg Leu Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

10

<210> 176  
< 211> 107  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

15

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 176

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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Thr Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Arg Ile Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

<210> 177

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 177

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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Thr Tyr  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Lys Leu Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

<210> 178

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

15

ES 2 635 594 T3

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 178

```

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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Asn Tyr
          20          25          30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35          40          45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Arg Leu Pro Tyr
          85          90          95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr
          100          105
    
```

5

<210> 179

< 211> 107

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

10

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 179

```

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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Trp His Tyr
          20          25          30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35          40          45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Arg Leu Pro Tyr
          85          90          95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr
          100          105
    
```

15

<210> 180

< 211> 107

ES 2 635 594 T3

< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

5

<400> 180  
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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr His Tyr  
20 25 30  
Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45  
Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
Ser Ser Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80  
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Lys Leu Pro Tyr  
85 90 95  
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

<210> 181  
< 211> 107  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial  
<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

10



ES 2 635 594 T3

<400> 181

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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Asp Tyr  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Met Leu Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

<210> 182

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 182

Gly 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Thr Tyr  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Lys Ile Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

10

<210> 183

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

ES 2 635 594 T3

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 183

```

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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr His Tyr
          20          25          30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35          40          45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Trp Lys Ile Pro Tyr
          85          90          95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr
          100          105
    
```

5

<210> 184

< 211> 107

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

10

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 184

```

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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Asn Tyr
          20          25          30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35          40          45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Lys Leu Pro Tyr
          85          90          95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr
          100          105
    
```

ES 2 635 594 T3

<210> 185  
 < 211> 107  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

5

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 185  
 Gly 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Lys Leu Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
 100 105

10

<210> 186  
 < 211> 107  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

15

<400> 186  
 Gly Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

ES 2 635 594 T3

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Asn Tyr  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Lys Leu Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

<210> 187  
< 211> 107  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

5

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 187  
Gly 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Asn Tyr  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Thr Leu Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

10

<210> 188  
< 211> 107  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

15

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 188

Gly 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Gly Tyr  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Thr Leu Pro Tyr  
85 90 95

Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

<210> 189

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 189

Gly 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Asp Tyr  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Thr Leu Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

<210> 190

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

15

ES 2 635 594 T3

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5  
 <220>  
 < 221> MOD\_RES  
 < 222> (1)..(1)  
 < 223> Ser, Lys o Arg

<400> 190  
 Xaa Tyr Asp Met Ser  
 1 5

10  
 <210> 191  
 < 211> 17  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15  
 <220>  
 < 221> MOD\_RES  
 < 222> (2)..(2)  
 < 223> Ile o Val

20  
 <220>  
 < 221> MOD\_RES  
 < 222> (4)..(4)  
 < 223> Ser o His

25  
 <220>  
 < 221> MOD\_RES  
 < 222> (7)..(7)  
 < 223> Gly o Ala

30  
 <220>  
 < 221> MOD\_RES  
 < 222> (14)..(14)  
 < 223> Thr o Ser

35  
 <220>  
 < 221> MOD\_RES  
 < 222> (15)..(15)  
 < 223> Val o Ala

<400> 191  
 Tyr Xaa Ser Xaa Gly Gly Xaa Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Xaa Xaa Lys  
 1 5 10 15

Gly

40  
 <210> 192  
 < 211> 10  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>  
 < 221> MOD\_RES

< 222> (4)..(4)  
< 223> Thr o Tyr

5  
<220>  
< 221> MOD\_RES  
< 222> (7)..(7)  
< 223> Tyr o Cys

10  
<220>  
< 221> MOD\_RES  
< 222> (10)..(10)  
< 223> Val, Glu, Leu, Met, Gln o Tyr

```

<400> 192
Gly Gly Val Xaa Lys Gly Xaa Phe Asp Xaa
 1          5          10
    
```

15  
<210> 193  
< 211> 11  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20  
<220>  
< 221> MOD\_RES  
< 222> (7)..(7)  
< 223> His, Tyr o Trp

25  
<220>  
< 221> MOD\_RES  
< 222> (8)..(8)  
< 223> Asn, Gly, Thr, Gln, Glu, His, Asp o Lys

30  
<220>  
< 221> MOD\_RES  
< 222> (9) .. (9)  
< 223> Tyr o Trp

35  
<220>  
< 221> MOD\_RES  
< 222> (11)..(11)  
< 223> Thr, Ala o Asn

```

<400> 193
Arg Ala Ser Gly Asn Ile Xaa Xaa Xaa Leu Xaa
 1          5          10
    
```

40  
<210> 194  
< 211> 7  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

45  
<220>  
< 221> MOD\_RES  
< 222> (1)..(1)  
< 223> Asn, Gln o Asp

<220>  
< 221> MOD\_RES  
< 222> (4)..(4)  
< 223> Thr, Asn, Ile, Glu o Ser

5           <220>  
            < 221> MOD\_RES  
            < 222> (6) .. (6)  
            < 223> Ala, Met o Glu

10           <220>  
            < 221> MOD\_RES  
            < 222> (7)..(7)  
            < 223> Asp, Glu, Ser o Ala

            <400> 194  
            **Xaa Ala Lys Xaa Leu Xaa Xaa**  
            1                                  5

15           <210> 195  
            < 211> 9  
            < 212> PRT  
            < 213> Secuencia artificial

20           <220>  
            < 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

            <220>  
            < 221> MOD\_RES  
            < 222> (2) .. (2)  
            < 223> His o Gln

25           <220>  
            < 221> MOD\_RES  
            < 222> (5)..(5)  
            < 223> Ser, Asn, Thr, Lys, Arg o Met

30           <220> <221> MOD\_RES  
            < 222> (6) .. (6)  
            < 223> Ile o Leu

            <220>  
            < 221> MOD\_RES  
            < 222> (8)..(8)  
            < 223> Tyr o Ala

35           <220>  
            < 221> MOD\_RES  
            < 222> (9) .. (9)  
            < 223> Thr, Ile o Asn

40           <400> 195  
            **Gln Xaa Phe Trp Xaa Xaa Pro Xaa Xaa**  
            1                                  5

            <210> 196  
            < 211> 119  
            < 212> PRT  
            < 213> Secuencia artificial

45           <220>  
            < 221> MOD\_RES  
            < 222> (4)..(4)  
            < 223> Thr, Asn, Ile, Glu o Ser



ES 2 635 594 T3

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 196

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

5

<210> 197

< 211> 107

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

10

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 197

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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Gly Trp  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Gln Ala Lys Thr Leu Met Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Asn Ile Pro Ala  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

<210> 198

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 198

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

10 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Val Thr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

ES 2 635 594 T3

<210> 199  
 < 211> 107  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

5

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 199  
 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
 100 105

10

<210> 200  
 < 211> 119  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

15

<400> 200  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30

ES 2 635 594 T3

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 201  
 < 211> 107  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

5

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 201  
 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
 100 105

10

<210> 202  
 < 211> 119  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

15

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 202

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Val Thr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 203

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 203

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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

<210> 204

<211> 119

5

10

ES 2 635 594 T3

< 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

5

<400> 204  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30  
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Gly Val Thr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 205  
 < 211> 107  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

10

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 205

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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

<210> 206

< 211> 119

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 206

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Val Thr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 207

< 211> 108

5

10

ES 2 635 594 T3

< 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

5

<400> 207  
 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 208  
 < 211> 119  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

10

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 208  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30  
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45



ES 2 635 594 T3

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

5

<210> 209  
< 211> 107  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 209  
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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr  
85 90 95

10

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

<210> 210  
< 211> 119  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

15

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 210

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 211

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 211

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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Thr Tyr  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Thr Leu Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
100 105

<210> 212

<211> 247

5

10

ES 2 635 594 T3

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

5

<400> 212

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Val Thr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Gln Val Gln  
115 120 125

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg  
130 135 140

Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Met Phe Gly Val His  
145 150 155 160

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ala Val  
165 170 175

Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg  
180 185 190

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ile Leu Phe Leu Gln Met  
195 200 205

Asp Ser Leu Arg Leu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly  
210 215 220

Arg Pro Lys Val Val Ile Pro Ala Pro Leu Ala His Trp Gly Gln Gly  
225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Phe Ser Ser  
245

ES 2 635 594 T3

<210> 213  
 < 211> 122  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

5

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 213  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Met Phe  
 20 25 30  
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Ala Val Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Glu Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ile Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Leu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Arg Pro Lys Val Val Ile Pro Ala Pro Leu Ala His Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Phe Ser Ser  
 115 120

10

<210> 214  
 < 211> 330  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 214

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

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

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225 230 235 240

ES 2 635 594 T3

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325 330

<210> 215  
< 211> 221  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

5

<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 215  
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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val  
115 120 125

10

<210> 216  
< 211> 108  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial

ES 2 635 594 T3

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 216

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Ser Ser Phe Leu Leu  
85 90 95

Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu His Lys Arg  
100 105

5

<210> 217

< 211> 254

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

10

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 217

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Val Thr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val  
 130 135 140

Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr  
 145 150 155 160

Phe Ser Met Phe Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly  
 165 170 175

Leu Glu Trp Val Ala Ala Val Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr  
 180 185 190

Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys  
 195 200 205

Asn Ile Leu Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Leu Glu Asp Thr Ala  
 210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Pro Lys Val Val Ile Pro Ala Pro  
 225 230 235 240

Leu Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Phe Ser Ser  
 245 250

5

<210> 218

< 211> 228

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial



ES 2 635 594 T3

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 218

```

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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
          20          25          30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35          40          45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr
          85          90          95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Val Ala Ala
          100          105          110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
          115          120          125

Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg
130          135          140

Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
145          150          155          160

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Glu Thr
          165          170          175

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr
          180          185          190

```

5

<210> 219

< 211> 247

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

10

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 219

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Met Phe  
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Gly Arg Pro Lys Val Val Ile Pro Ala Pro Leu Ala His Trp  
 100 105 110

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

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 130 135 140

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
 145 150 155 160

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 165 170 175

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 180 185 190

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe  
 195 200 205

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
 210 215 220

Ala Arg Gly Gly Val Thr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
 225 230 235 240

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
 245

5

<210> 220

< 211> 221

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

10

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 220

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Ser Ser Phe Leu Leu  
 85 90 95

Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu His Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
 115 120 125

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn  
 130 135 140

Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu  
 145 150 155 160

Ile Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
 165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
 180 185 190

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro  
 195 200 205

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg  
 210 215 220

5

<210> 221  
 < 211> 254  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

10

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 221

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Met Phe  
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Gly Arg Pro Lys Val Val Ile Pro Ala Pro Leu Ala His Trp  
100 105 110

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

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly

<210> 222

<211> 228

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 222

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Ser Ser Phe Leu Leu  
85 90 95

10

<210> 223

<211> 9

< 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5 <400> 223  
**Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly**  
 1 5

<210> 224  
 < 211> 6  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

10

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 224  
**Arg Thr Val Ala Ala Pro**  
 1 5

15

<210> 225  
 < 211> 13  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

20

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 225  
**Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro**  
 1 5 10

25

<210> 226  
 < 211> 247  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 226

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Gln Val Gln  
 115 120 125

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg  
 130 135 140

Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Met Phe Gly Val His  
 145 150 155 160

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ala Val  
 165 170 175

Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg  
 180 185 190

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ile Leu Phe Leu Gln Met  
 195 200 205

Asp Ser Leu Arg Leu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly  
 210 215 220

Arg Pro Lys Val Val Ile Pro Ala Pro Leu Ala His Trp Gly Gln Gly  
 225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 245

5

<210> 227

< 211> 122

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

10

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 227

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Met Phe  
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Gly Arg Pro Lys Val Val Ile Pro Ala Pro Leu Ala His Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 228

<211> 221

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

5

ES 2 635 594 T3

<400> 228

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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val  
115 120 125

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser  
130 135 140

Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu  
145 150 155 160

Ile Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
180 185 190

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Ser Ser Phe Leu  
195 200 205

Leu Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
210 215 220

<210> 229

< 211> 108

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético



ES 2 635 594 T3

<400> 229

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Ser Ser Phe Leu Leu  
85 90 95

Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 230

< 211> 247

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

5

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 230

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

10

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe

<210> 231

< 211> 221

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

15

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 231

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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr  
 85 90 95

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

Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val  
 115 120 125

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser  
 130 135 140

Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu  
 145 150 155 160

Ile Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
 165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
 180 185 190

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Ser Ser Phe Leu  
 195 200 205

Leu Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu His Lys Arg  
 210 215 220

5

<210> 232  
 <211> 247  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 232

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30

ES 2 635 594 T3

<210> 233  
 < 211> 221  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

5

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 233  
 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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val  
 115 120 125  
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser  
 130 135 140  
 Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu  
 145 150 155 160  
 Ile Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
 165 170 175  
 Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
 180 185 190  
 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Ser Ser Phe Leu  
 195 200 205  
 Leu Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu His Lys Arg  
 210 215 220

10

<210> 234  
 < 211> 247  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

ES 2 635 594 T3

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 234

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Val Thr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Gln Val Gln  
 115 120 125

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg  
 130 135 140

Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Met Phe Gly Val His  
 145 150 155 160

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ala Val  
 165 170 175

Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg  
 180 185 190

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ile Leu Phe Leu Gln Met  
 195 200 205

Asp Ser Leu Arg Leu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly  
 210 215 220

Arg Pro Lys Val Val Ile Pro Ala Pro Leu Ala His Trp Gly Gln Gly  
 225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 245

5

<210> 235

< 211> 221

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

ES 2 635 594 T3

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 235

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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val  
115 120 125

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser  
130 135 140

Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu  
145 150 155 160

Ile Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
180 185 190

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Ser Ser Phe Leu  
195 200 205

Leu Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

5

210

215

220

<210> 236

< 211> 254

< 212> PRT

10

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 236

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Val Thr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val  
 130 135 140

Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr  
 145 150 155 160

Phe Ser Met Phe Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly  
 165 170 175

Leu Glu Trp Val Ala Ala Val Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr  
 180 185 190

Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys  
 195 200 205

Asn Ile Leu Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Leu Glu Asp Thr Ala  
 210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Pro Lys Val Val Ile Pro Ala Pro  
 225 230 235 240

Leu Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Phe Ser Ser  
 245 250

5

<210> 237  
 < 211> 228  
 < 212> PRT  
 < 213> Secuencia artificial

10

<220>  
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 237

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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr  
 85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro  
 115 120 125

Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg  
 130 135 140

Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 145 150 155 160

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Glu Thr  
 165 170 175

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr  
 180 185 190

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 195 200 205

Gln Gln Thr Ser Ser Phe Leu Leu Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val  
 210 215 220

Glu His Lys Arg  
 225

5

<210> 238  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 635 594 T3

<400> 238

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 Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg  
100 105

<210> 239

< 211> 108

5

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 239

10

<210> 240

< 211> 30

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 240

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

15

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

<210> 241

< 211> 14

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

20

<400> 241

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala  
1 5 10

<210> 242

< 211> 32

< 212> PRT

25

< 213> Homo sapiens



ES 2 635 594 T3

<400> 242

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
20 25 30

<210> 243

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

5

<400> 243

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

<210> 244

< 211> 30

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

10

<400> 244

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

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

<210> 245

< 211> 14

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

15

<400> 245

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

<210> 246

< 211> 32

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

25

<400> 246

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
20 25 30

<210> 247

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

30

<400> 247

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

<210> 248

< 211> 30

ES 2 635 594 T3

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 248  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

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

5  
 <210> 249  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 249  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly  
 1 5 10

10  
 <210> 250  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15  
 <400> 250  
 Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu  
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

20  
 <210> 251  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 251  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

25  
 <210> 252  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 252  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

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

30  
 <210> 253  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 253  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala  
 1 5 10

ES 2 635 594 T3

<210> 254  
 < 211> 32  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

5 <400> 254  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 255  
 < 211> 11  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

10 <400> 255  
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 256  
 < 211> 30  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

15 <400> 256  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
 20 25 30

<210> 257  
 < 211> 14  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

20 <400> 257  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 1 5 10

<210> 258  
 < 211> 32  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

25 <400> 258  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 259  
 < 211> 11  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

30

ES 2 635 594 T3

<400> 259  
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

5

<210> 260  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 260  
 Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser  
 20 25 30

10

<210> 261  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 261  
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala  
 1 5 10

15

<210> 262  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 262  
 Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr  
 1 5 10 15  
 Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

20

<210> 263  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25

<400> 263  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 264  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30

<400> 264  
 Glu Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser  
 20 25 30

35

<210> 265  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

ES 2 635 594 T3

<400> 265  
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala  
 1 5 10

5  
 <210> 266  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 266  
 Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu Thr  
 1 5 10 15  
 Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

10  
 <210> 267  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 267  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

15  
 <210> 268  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 268  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
 20 25 30

20  
 <210> 269  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25  
 <400> 269  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly  
 1 5 10

30  
 <210> 270  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 270  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 271  
 <211> 11

ES 2 635 594 T3

< 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 271  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

5 <210> 272  
 < 211> 30  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 272  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

10 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
 20 25 30

<210> 273  
 < 211> 14  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

15 <400> 273  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 1 5 10

20 <210> 274  
 < 211> 32  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 274  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

25 <210> 275  
 < 211> 11  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 275  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

30 <210> 276  
 < 211> 30  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 276  
 Glu 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 Gly Thr Phe Ser  
 20 25 30

ES 2 635 594 T3

<210> 277  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 277  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly  
 1 5 10

<210> 278  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 278  
 Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 279  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15

<400> 279  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 280  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20

<400> 280  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
 20 25 30

25

<210> 281  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 281  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly  
 1 5 10

30

<210> 282  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

ES 2 635 594 T3

<400> 282

Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu  
1 5 10 15

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
20 25 30

<210> 283

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

5

<400> 283

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

<210> 284

< 211> 30

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

10

<400> 284

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser  
20 25 30

15

<210> 285

< 211> 14

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 285

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
1 5 10

20

<210> 286

< 211> 32

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

25

<400> 286

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys  
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
20 25 30

<210> 287

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

30

<400> 287

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

<210> 288

< 211> 30



ES 2 635 594 T3

< 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 288  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser  
 20 25 30

5  
 <210> 289  
 < 211> 14  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 289  
 Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 1 5 10

10

<210> 290  
 < 211> 32  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

15

<400> 290  
 Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Ser Phe Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

20

<210> 291  
 < 211> 11  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 291  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

25

<210> 292  
 < 211> 30  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 292  
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser  
 20 25 30

30

<210> 293  
 < 211> 14  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 293  
 Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 1 5 10

ES 2 635 594 T3

<210> 294  
 < 211> 32  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

5 <400> 294  
 Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Tyr Leu Lys  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Ser Val Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

10 <210> 295  
 < 211> 11  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 295  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

15 <210> 296  
 < 211> 30  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 296  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Thr Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser  
 20 25 30

20 <210> 297  
 < 211> 14  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 297  
 Trp Ile Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 1 5 10

25 <210> 298  
 < 211> 32  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 298  
 Gln Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Phe Asn Thr Phe Phe Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

30 <210> 299  
 < 211> 11  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

ES 2 635 594 T3

<400> 299  
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

5  
 <210> 300  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 300  
 Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser  
 20 25 30

10  
 <210> 301  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 301  
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 1 5 10

15  
 <210> 302  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20  
 <400> 302  
 Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Val Leu Thr  
 1 5 10 15  
 Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

25  
 <210> 303  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 303  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

30  
 <210> 304  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 304  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Ser Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg  
 20 25 30

35  
 <210> 305  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

ES 2 635 594 T3

<400> 305  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala  
 1 5 10

5  
 <210> 306  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 306  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys  
 20 25 30

10  
 <210> 307  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 307  
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

15  
 <210> 308  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 308  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly  
 20 25 30

20  
 <210> 309  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25  
 <400> 309  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala  
 1 5 10

30  
 <210> 310  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 310  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys  
 20 25 30

<210> 311  
 <211> 11

ES 2 635 594 T3

< 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 311  
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

5 <210> 312  
 < 211> 11  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

10 <400> 312  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 313  
 < 211> 30  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

15 <400> 313  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
 20 25 30

20 <210> 314  
 < 211> 14  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 314  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly  
 1 5 10

25 <210> 315  
 < 211> 32  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 315  
 Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

30 Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 316  
 < 211> 11  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

35 <400> 316  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

40 <210> 317  
 < 211> 15  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

ES 2 635 594 T3

<400> 317  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

5  
 <210> 318  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 318  
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

10  
 <210> 319  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 319  
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 1 5 10

15  
 <210> 320  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 320  
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

20  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
 20

<210> 321  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25  
 <400> 321  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

<210> 322  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 30  
 <213> Homo sapiens

<400> 322  
 Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 323  
 <211> 10

ES 2 635 594 T3

< 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 323  
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 1 5 10

5 <210> 324  
 < 211> 23  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

10 <400> 324  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys  
 20

15 <210> 325  
 < 211> 15  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 325  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

20 <210> 326  
 < 211> 32  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 326  
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15  
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

25 <210> 327  
 < 211> 11  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

30 <400> 327  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 1 5 10

<210> 328  
 < 211> 23  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

35 <400> 328  
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
 20

ES 2 635 594 T3

<210> 329  
 < 211> 15  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

5

<400> 329  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

<210> 330  
 < 211> 32  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

10

<400> 330  
 Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 331  
 < 211> 11  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

15

<400> 331  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 1 5 10

<210> 332  
 < 211> 23  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

20

<400> 332  
 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  
 20

<210> 333  
 < 211> 15  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

25

<400> 333  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

30

<210> 334  
 < 211> 32  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens



ES 2 635 594 T3

<400> 334

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 335

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

5

<400> 335

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
1 5 10

<210> 336

< 211> 23

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

10

<400> 336

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
20

15

<210> 337

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 337

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
1 5 10 15

20

<210> 338

< 211> 32

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

25

<400> 338

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 339

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

30

<400> 339

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
1 5 10

<210> 340

< 211> 22

ES 2 635 594 T3

< 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 340  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

5

Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
 20

<210> 341  
 < 211> 15  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

10

<400> 341  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 1 5 10 15

15

<210> 342  
 < 211> 32  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 342  
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

20

<210> 343  
 < 211> 10  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 343  
 Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
 1 5 10

25

<210> 344  
 < 211> 22  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 344  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

30

Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
 20

<210> 345  
 < 211> 15  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

ES 2 635 594 T3

<400> 345  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 1 5 10 15

5

<210> 346  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 346  
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

10

<210> 347  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 347  
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 1 5 10

15

<210> 348  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 348  
 Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr  
 1 5 10 15

20

Ala Ser Ile Thr Cys  
 20

<210> 349  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25

<400> 349  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 1 5 10 15

30

<210> 350  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 350  
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 351  
 <211> 10

ES 2 635 594 T3

< 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 351  
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

5 <210> 352  
 < 211> 22  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 352  
 Leu Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

10 Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
 20

<210> 353  
 < 211> 15  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

15 <400> 353  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 1 5 10 15

20 <210> 354  
 < 211> 32  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 354  
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys  
 20 25 30

25 <210> 355  
 < 211> 11  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 355  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly  
 1 5 10

30 <210> 356  
 < 211> 23  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 356  
 Glu Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys  
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys  
 20

ES 2 635 594 T3

<210> 357  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 357  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Val Ile Tyr  
 1 5 10 15

<210> 358  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 358  
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Asp Ala Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 359  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15

<400> 359  
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 1 5 10

<210> 360  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20

<400> 360  
 Glu Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
 20

25

<210> 361  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 361  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Val Ile Tyr  
 1 5 10 15

30

<210> 362  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

35

<400> 362  
 Asp Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Glu Ala Thr



ES 2 635 594 T3

<400> 368

Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
20

<210> 369

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

5

<400> 369

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
1 5 10 15

<210> 370

< 211> 32

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

10

<400> 370

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys  
20 25 30

15

<210> 371

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 371

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
1 5 10

20

<210> 372

< 211> 22

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

25

<400> 372

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
20

<210> 373

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

30

<400> 373

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
1 5 10 15

<210> 374

< 211> 32

ES 2 635 594 T3

< 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 374  
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys  
 20 25 30

5  
 <210> 375  
 < 211> 10  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 375  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 1 5 10

<210> 376  
 < 211> 23  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

15  
 <400> 376  
 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  
 20

20  
 <210> 377  
 < 211> 15  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 377  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

25  
 <210> 378  
 < 211> 32  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 378  
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

30  
 Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 379  
 < 211> 11  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

35  
 <400> 379  
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 1 5 10



ES 2 635 594 T3

<210> 380  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5 <400> 380  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 1 5 10

10 <210> 381  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 381

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Lys Tyr  
 20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Glu Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
 115

15

**REIVINDICACIONES**

1. Una proteína de unión que comprende una primera y una segunda cadenas polipeptídicas, en donde dicha primera cadena polipeptídica comprende un primer VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>, en donde:

VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada;

5 VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada;

C es un dominio constante de cadena pesada;

X1 es un enlazador con la condición de que no sea CH1;

X2 es una región Fc; y

n es independientemente 0 o 1; y

10 en donde dicha segunda cadena polipeptídica comprende un segundo VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>, en donde:

VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera;

C es un dominio constante de cadena ligera;

X1 es un enlazador con la condición de que no sea CH1;

15 X2 no comprende una región Fc; y

n es independientemente 0 o 1;

en donde, dicha primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 212; en donde dicha segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 215; y en donde la proteína de unión se une a IL-1β humana y a IL-1α humana.

20 2. Una proteína de unión según la reivindicación 1, en donde:

VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub> en la primera cadena polipeptídica es SEQ ID NO: 212 y C-(X2)<sub>n</sub> en la primera cadena polipeptídica es SEQ ID NO: 214; y

VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2 en la segunda cadena polipeptídica es SEQ ID NO: 215 y C-(X2)<sub>n</sub> en la segunda cadena polipeptídica es SEQ ID NO: 5.

25 3. Una proteína de unión según la reivindicación 1, en donde la región constante de la cadena pesada es una región constante de la cadena pesada de IgG1.

4. Una proteína de unión según la reivindicación 3, en donde la región constante de la cadena pesada de IgG1 comprende mutaciones en la región bisagra L234A y L235A.

30 5. La proteína de unión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la proteína de unión comprende dos primeras cadenas polipeptídicas y dos segundas cadenas polipeptídicas.

6. La proteína de unión E26.13-SS-X3 de inmunoglobulina con doble dominio variable (DVD-Ig), en donde las secuencias de las regiones variables y constantes se definen como sigue:

<b>Región de la proteína</b>	<b>Identificador de secuencia</b>
Cadena pesada variable (VH)	SEQ ID NO: 212
Cadena pesada constante (CH)	SEQ ID NO: 214
Cadena ligera variable (VL)	SEQ ID NO: 215
Cadena ligera constante (CL)	SEQ ID NO: 5.

35 7. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

8. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión descrita en una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

9. Un vector que comprende una o varias moléculas de ácido nucleico aisladas según la reivindicación 8.
  10. Una célula hospedadora que comprende un vector según la reivindicación 9.
  11. Un método para producir una proteína de unión, que comprende cultivar una célula hospedadora descrita en la reivindicación 10 en un medio de cultivo en condiciones suficientes para producir la proteína de unión.
- 5
12. Una proteína de unión descrita en una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para uso en el tratamiento de un sujeto mediante la administración al sujeto de la proteína de unión tal como se ha descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, de tal manera que se logra el tratamiento.