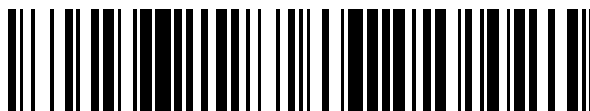


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 335**

51 Int. Cl.:

**A61P 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.07.2014 PCT/EP2014/064163**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2015 WO15001010**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2014 E 14735565 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 3016977**

54 Título: **Anticuerpos humanos anti-IL-32**

30 Prioridad:

**03.07.2013 EP 13174937**

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

**22.06.2020**

73 Titular/es:

**IMMUNOQUIRE AG (100.0%)  
Königsallee 90  
40212 Düsseldorf, DE**

72 Inventor/es:

**HAYDAY, ADRIAN;  
KISAND, KAI;  
KROHN, KAI;  
MACAGNO, ANNALISA;  
ONUOHA, SHIMOBİ;  
PETERSON, PÄRT;  
ROTHE, MIKE;  
WOODWARD, MARTIN y  
HAQUE, SYEDA F. Y.**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

ES 2 768 335 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

Anticuerpos humanos anti-IL-32

## 5 Campo de la invención

**[0001]** La presente invención se refiere en general a anticuerpos monoclonales humanos novedosos, así como fragmentos, derivados y variantes de los mismos. En particular, la presente invención se refiere a anticuerpos anti-IL-32 derivados de pacientes humano recombinantes y fragmentos de unión a IL-32 de los mismos. Además, se describen composiciones que comprenden tales moléculas de unión, anticuerpos y miméticos de los mismos útiles en el tratamiento y diagnóstico de los trastornos. Además, la presente invención se refiere a los anticuerpos anti-IL-32 y equivalentes mencionados de los mismos para su uso en inmunoterapia, así como dianas en la intervención terapéutica de trastornos autoinmunes y autoinflamatorios, así como tumores malignos, tales como diversas formas de artritis, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), miastenia gravis (MG), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, inflamación vascular y aterosclerosis, dermatitis atópica y el cáncer.

## Antecedentes de la invención

**[0002]** Las respuestas inapropiadas del sistema inmunitario pueden causar síntomas de estrés al organismo involucrado. Respuestas inmunitarias exageradas a sustancias extrañas o estados físicos que por lo general no tienen un efecto significativo sobre la salud de un animal o humano puede dar lugar a alergias con síntomas que van desde reacciones leves, tales como irritaciones de la piel a situaciones mortales, como un shock anafiláctico o diversos tipos de vasculitis. Las respuestas inmunitarias a antígenos endógenos pueden causar trastornos autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico, anemia hemolítica autoinmune idiopática, anemia perniciosa, diabetes mellitus tipo 1, enfermedades ampollas de la piel y diferentes tipos de artritis.

**[0003]** Las respuestas inmunitarias se producen de una manera coordinada, implicando varios tipos de células y requiriendo comunicación por moléculas de señalización, tales como citocinas entre los tipos de células implicadas. Esta comunicación puede ser influenciada o inhibida por, por ejemplo, la interceptación de las señales o el bloqueo de los respectivos receptores.

**[0004]** Las citocinas son proteínas, péptidos y glicoproteínas secretadas solubles que actúan como reguladores humorales en concentraciones nanomolares a picomolares comportándose como hormonas clásicas en que actúan a nivel sistémico y que, ya sea en condiciones normales o patológicas, modulan las actividades funcionales de células individuales y tejidos. Las citocinas se diferencian de las hormonas en que no son producidas por células especializadas organizadas en glándulas especializadas, es decir, no hay un solo órgano o fuente celular para estos mediadores, ya que son expresada por prácticamente todas las células implicadas en la inmunidad innata y adaptativa, tales como células epiteliales, macrófagos, células dendríticas (DC), células asesinas naturales (NK) y especialmente por las células T, destacadas entre las cuales se encuentran los linfocitos T auxiliares (Th).

**[0005]** En función de sus respectivas funciones, las citocinas se pueden clasificar en tres categorías funcionales: regulación de las respuestas inmunitarias innatas, regulación de las respuestas inmunitarias adaptativas y estimulación de la hematopoyesis. Debido a sus actividades pleiotrópicas dentro de dicho tres categorías, por ejemplo, en relación con la activación, la proliferación, la diferenciación, el reclutamiento celular, u otras respuestas fisiológicas, por ejemplo, la secreción de proteínas características de la inflamación por las células diana, se ha encontrado que los trastornos de la señalización celular mediada por la producción de citocinas regulada de manera aberrante son una causa de muchos trastornos asociados con la respuesta inmunitaria defectuosa, por ejemplo, la inflamación y el cáncer.

**[0006]** La interleucina-32 (IL-32, también conocida como proteína 4 de células asesinas naturales) es una citocina descubierta recientemente con funciones importantes en la defensa del huésped y la inmunidad innata. El gen de IL-32 humano está localizado en el cromosoma 16p13.3. Además de humanos y simios, hasta ahora se han encontrado homólogos bovino, porcino y equino, sin embargo no se conocen homólogos de ratón hasta el momento. Se conocen seis isoformas de IL-32, producidas por corte y empalme alternativo (Chen et al., *Horm Vitam* 74 (2006), 207-228). La isoforma más larga, IL-32gamma (IL-32 $\gamma$  o IL-32g) comprende 234 aa (UniProtKB/Swiss-Prot identificador: P24001-1). La segunda isoforma, también conocida como IL-32beta (IL-32 $\beta$  o IL-32b; UniProtKB/Swiss-Prot identificador: P24001-2) tiene 188 aa. La tercera isoforma de 178 aa es también conocida como IL-32delta (IL-32 $\delta$  o IL-32d; UniProtKB/Swiss-Prot identificador: P24001-3). IL-32alfa (IL-32 $\alpha$  o IL-32a) de 131 aa es la cuarta isoforma (UniProtKB/Swiss-Prot identificador: P24001-4). La isoforma 5 (UniProtKB/Swiss-Prot identificador: P24001-5) y la isoforma 6 (UniProtKB/Swiss-Prot identificador: P24001-6) tienen 168 aa y 179 aa, respectivamente. Sin embargo, también pueden existir más isotipos, por ejemplo, un potencial nuevo isotipo de 112 aa ha sido descrito por Imaeda et al., (*Mol Med Rep.* 4 (2011), 483-487).

**[0007]** El receptor para IL-32 es desconocido hasta ahora. Sin embargo, existen algunos datos que indica que IL-32 se puede unir y escindir en la membrana celular por la proteinasa 3 que implican a esta molécula como un posible receptor, en el que los fragmentos producidos pueden tener actividad biológica y activar la proteína 2

inflamatoria de macrófagos e IL-8 (Dinarello y Kim, *Ann Rheum Dis* 65 Suppl 3 (2006); iii 61-64). IL-32 está implicada como un regulador principal de las vías inflamatorias con una sinergia pronunciada con TNF $\alpha$  en forma de un bucle que se autoperpetúa donde IL-32 promueve la expresión de TNF $\alpha$  y viceversa dando como resultado la amplificación de mediadores proinflamatorios. Se ha descrito que inducen diversas citocinas, tales como TNF $\alpha$ /TNF-  
 5 alfa, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, y la proteína-2 inflamatoria de macrófagos (MIP-2), para activar la típica vía de señalización de citocinas de NF-kappa-B y p38 MAPK y es un gen inducible por IL-18 (Kim et al, *Immunity* 22 (2005), 131-142; Netea et al, *Proc Natl Acad Sci USA*. 105 (2008), 3515-3520; Netea et al, *Proc Natl Acad Sci USA*. 102 (2005), 16.309-16.314; Joosten et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (2006), 3298-3303). Recientemente, también se demostró que la IL-32 aumenta la producción de IFN- $\gamma$  por las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs; Nold et al, *J*  
 10 *Immunol* 181 (2008), 557-565; Netea et al, *PLoS Med* 3 (2006), e277).

**[0008]** Se ha descrito que IL-32 se produce principalmente por las células NK, linfocitos T, células epiteliales, y los monocitos de sangre estimulados por IL-2 o IFN- $\gamma$  (Dahl et al., *J Immunol*. 148 (1992), 597-603; Kim et al, (2005)). Además, se ha observado que la IL-32 se sobreexpresa en biopsias de tejido sinovial con artritis reumatoide  
 15 (RA), en el que el nivel de expresión de IL-32 se correlacionaba positivamente con la gravedad de la inflamación (Alsaleh et al., *Arthritis Res Ther*. 12 (2010), R135; Cagnard et al, *Eur Cytokine Netw* 16 (2005), 289-292). Además de diversas formas de artritis, tales como artritis reumatoide (RA) o la espondilitis anquilosante (Ciccica et al., *Rheumatology* 51 (2012), 1966-1972), que pertenece a la familia de las espondiloartropatías, se encontró que la IL-32 estaba asociada funcionalmente con varias otra enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), miastenia gravis  
 20 (MG), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, enfermedad de Crohn, psoriasis, dermatitis atópica y cáncer (Alsaleh et al, (2010); Breenan y Beech, *Curr Opin. Rheumatol*, 19 (2007), 296-301; Asquith y McInnes, *Curr Opin Rheumatol*, 19 (2007), 246-251; Dinarello y Kim, *Ann Rheum Dis* 65 Suppl 3 (2006); iii 61-64; Fantini et al, *Inflamm Bowel Dis* 13 (2007), 1419-1423; Lee et al, *Oncology Letters* 3 (2012), 490-496). La alta tasa de aterosclerosis en RA sugirió también un posible papel de la IL-32 en las vías inflamatorias de la inflamación vascular  
 25 y la aterosclerosis, cuyas implicaciones han sido también verificadas, por ejemplo, mediante la detección de la expresión de IL-32, con una expresión de ARNm de IL-32 $\beta$  y IL-32 $\gamma$  significativamente mayor en la pared de vasos arteriales ateroscleróticos humanos (Kobayashi et al, *PLoS One* 5 (2010); e9458; Heinhuis et al, *Cytokine* (2013), S1043-4666). IL-32 también puede jugar un papel en las respuestas inmunitarias a la tuberculosis (Kundu y Basu, *PLoS Med*, 3 (2006), E274; Netea et al., 2006). También, se ha observado un aumento de la transcripción de IL-32  
 30 después de la infección por bacterias y virus, tales como *Mycobacterium tuberculosis* (Netea et al., 2006) o de la gripe A (Li et al., *PLoS One*. 3 (2008), e1985) que indica su posible papel en la defensa del huésped. De acuerdo con ello, IL-32 representa una nueva diana terapéutica no comprendida completamente, aunque importante y hay una necesidad de moléculas de unión específicas de IL-32 que neutralizan la función de todos los isotipos de IL-32, subintervalos seleccionados de los mismos o isotipos de IL-32 singulares, por ejemplo, IL-32 $\gamma$ .

**[0009]** Los primeros intentos para proporcionar tales moléculas son conocidos. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. US 7,641,904 B2 por Kim et al. proporciona anticuerpos monoclonales IL-32 murinos, en los que uno de los anticuerpos reconoce selectivamente IL-32 $\alpha$ , en el que otro anticuerpo se une a IL-32 $\alpha$ , IL-32 $\beta$  e IL-32 $\gamma$ . La solicitud internacional WO 2005/047478 describe la generación de fragmentos de anticuerpos murinos específicos  
 40 para IL-32 $\alpha$  e IL-32 $\beta$ . Sin embargo, aparentemente todavía no se han proporcionado anticuerpos específicos para IL-32 $\gamma$ .

**[0010]** Además, debido a las respuestas inmunológicas a anticuerpos exógenos, como los anticuerpos de ratón en seres humanos (HAMA-response; Schroff et al, *Cancer Res* 45 (1985), 879-885; Shawler et al, *J. Immunol* 135  
 45 (1985), 1530-1535), se utilizan versiones mayoritariamente humanizadas de anticuerpos en los actuales enfoques terapéuticos (Chan et Carter, *Nature Reviews Immunology* 10 (2010), 301-316; Nelson et al, *Nature Reviews Drug Discovery* 9 (2010), 767-774). Un enfoque para obtener tales anticuerpos fue trasplantar las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en un marco completamente humano, un proceso conocido como humanización de anticuerpo (Jones et al., *Nature* 321 (1986), 522-525). Este enfoque a menudo se complica por el hecho de que la  
 50 CDR de ratón no transfiere fácilmente a un marco de dominio variable humano, lo que resulta en una menor afinidad del anticuerpo humanizado sobre su anticuerpo murino parental. Por lo tanto, a menudo se requieren experimentos de mutagénesis adicionales y elaborados para aumentar la afinidad de los anticuerpos así modificados. Otro enfoque para la consecución de anticuerpos humanizados es inmunizar ratones que han sustituido sus genes de anticuerpos innatos por genes de anticuerpos humanos y aislar los anticuerpos producidos por estos animales. Sin  
 55 embargo, este procedimiento todavía requiere la inmunización con un antígeno, que no es posible con todos los antígenos, debido a la toxicidad de algunos de ellos. Además, este procedimiento se limita a la producción de ratones transgénicos de una cepa específica.

**[0011]** Otro procedimiento para generar anticuerpos es el uso de bibliotecas de anticuerpos humanos, tales como  
 60 la expresión en fagos, tal como se describe, por ejemplo, para la generación de anticuerpos específicos de IL-13 en la solicitud internacional WO 2005/007699. Aquí, los bacteriófagos están diseñados para expresar fragmentos scFv/Fab humanos en su superficie mediante la inserción de un gen de anticuerpo humano en la población de fagos. Desafortunadamente, hay un número de desventajas de este procedimiento también, incluyendo la limitación de tamaño de la secuencia de la proteína para la expresión polivalente, la necesidad de la secreción de las  
 65 proteínas, es decir, fragmentos scFv/Fab de anticuerpo, a partir de bacterias, los límites de tamaño de la biblioteca, número limitado de posibles anticuerpos producidos y probados, una proporción reducida de anticuerpos con

hipermutación somática producidos por inmunización natural y que todas las proteínas codificadas por fago son proteínas de fusión, que pueden limitar la actividad o la accesibilidad para la unión de algunas proteínas. Un inconveniente grave adicional de esta técnica es que los anticuerpos producidos de este modo conllevan el riesgo de reactividad cruzada no deseada contra autoantígenos y carecen de las características de anticuerpos humanos naturales optimizados evolutivos producidos por el sistema inmunológico humano. Además, tales anticuerpos pueden no ser lo suficientemente específicos debido a la reactividad cruzada con otras proteínas y/o con la proteína diana en el contexto de entorno fisiológico normal y la función. Del mismo modo, la solicitud de patente europea EP 0 616 640 A1 describe la producción de auto-anticuerpos a partir de repertorios de segmentos de anticuerpos en fagos. Bibliotecas de fagos se generan a partir de seres humanos no inmunizados a este respecto (véase, por ejemplo, el Ejemplo 1; página 16, líneas 43-51; Ejemplo 2, en la página 17, párrafo [0158], líneas 57-58). Sin embargo, también los procedimientos descritos en esta solicitud de patente adolecen de desventajas anteriormente mencionadas generales de anticuerpos generados a partir de bibliotecas de fagos, en comparación con los anticuerpos producidos y madurados en un mamífero, es decir, cuerpo humano. Lee et al., *Hybridoma* 29 (2010), 501-509 describe anticuerpos anti-IL-32 $\gamma$  murinos y sugiere el uso de estos anticuerpos para el diagnóstico de enfermedades inflamatorias y autoinmunes relacionadas con IL-32.

**[0012]** En vista de lo anterior, todavía existe una necesidad de compuestos adicionales y nuevos para el tratamiento y diagnóstico de trastornos o condiciones asociadas con actividad perjudicial de IL-32, como moléculas de unión de alta especificidad para IL-32 o específicas para un conjunto seleccionado de o un solo isotipo de IL-32, en particular de anticuerpos específicos para IL-32 $\gamma$ , que son tolerables en los seres humanos para monoterapia o enfoques combinatorios.

**[0013]** La solución a este problema es proporcionada por las realizaciones de la presente invención, tal como se caracteriza en las reivindicaciones y se describe en la descripción y se ilustra en los ejemplos y figuras a continuación.

#### Características de la invención

**[0014]** El alcance de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas. La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales humanos específicos de IL-32 y fragmentos de unión a IL-32 y derivados de los mismos, tal como se caracteriza en las reivindicaciones. En particular, los anticuerpos monoclonales anti-IL-32 humanos están provistos de un perfil de unión hacia IL-32 $\gamma$  y muestran una actividad de unión y neutralización *in vitro* e *in vivo*, tal como se muestra en los ejemplos y las figuras adjuntas. Debido a sus propiedades de neutralización, los anticuerpos de la presente invención tiene una utilidad terapéutica, de pronóstico y diagnóstico, que los hacen especialmente valiosos para aplicaciones en relación con diversos trastornos y afecciones autoinmunes e inflamatorias asociados con/que implican la actividad de IL-32 en la iniciación y/o el mantenimiento de las respuestas inmunitarias no deseadas, tales como diversas formas de artritis (por ejemplo, artritis reumatoide (RA) o espondiloartritis), miastenia gravis (MG), enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), enfermedades pulmonares, tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y asma, enfermedad de Crohn, psoriasis, inflamación vascular y aterosclerosis, dermatitis atópica y el cáncer; véase también la sección de Antecedentes de la invención anteriormente para estas indicaciones y otras posibles indicaciones terapéuticas y de diagnóstico anti-IL-32.

**[0015]** Los anticuerpos de la presente invención se han aislado de mamíferos, en particular seres humanos, que están afectados con una tolerancia central y/o periférica alterada o pérdida de la auto-tolerancia que pueden ser debidas a, o están asociadas con, una génesis interrumpida o desregulada de auto-tolerancia, preferiblemente causada por un trastorno autoinmune monogénico. Los ejemplos de mamíferos que proporcionan una fuente particularmente adecuada para autoanticuerpos de acuerdo con la presente invención son mamíferos, por ejemplo, seres humanos que tienen un trastorno asociado con una mutación en el gen *AIRE* (regulador autoinmune), tal como síndrome de poliendocrinopatía autoinmune de tipo 1 (APS1) (Peterson et al., *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008), 948-957), el síndrome de poliendocrinopatía autoinmune de tipo 2 (APS2) (Baker et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95 (2010), E263-E270 ) y el síndrome de inmunodesregulación - poliendocrinopatía - enteropatía ligada a X (IPEX) (Powell et al., *J. Pediatr* 100 (1982), 731-737; Ochs et al., *Immunol Rev.* 203 (2005), 156-164). Preferiblemente, los pacientes de los que se aislaron los anticuerpos presentaban serorreactividad contra al menos uno de los isotipos de IL-32 humanos, lo más preferiblemente hacia IL-32 $\gamma$ .

**[0016]** En particular, los experimentos realizados de acuerdo con la presente invención tuvieron éxito en el aislamiento de IL-32, en particular de anticuerpos específicos de IL-32 $\gamma$  de pacientes de APS1. Por lo tanto, la presente invención se refiere en general a anticuerpos monoclonales neutralizantes de IL-32 de alta afinidad, tal como se caracterizan en las reivindicaciones. Por consiguiente, la presente invención proporciona anticuerpos humanos monoclonales (mAbs, o mAbs) contra IL-32 $\gamma$ , que se describirá en detalle a continuación, que se consideran que son agentes terapéuticos seguros y efectivos para trastornos en los que está implicada esta citocina.

**[0017]** Naturalmente, la presente invención se extiende a los ácidos nucleicos, en particular, el ADNc que codifica al menos una región variable y/o constante de los anticuerpos de la presente invención, vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos, líneas de células productoras de anticuerpos y células recombinantes. La presente

invención se refiere además a composiciones farmacéuticas, ensayos de diagnóstico y kits que comprenden los anticuerpos aislados de acuerdo con la presente invención y a los procedimientos terapéuticos basados en los mismos.

5 **[0018]** Otras realizaciones de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción y ejemplos que siguen. Al hacer esto, y si no se indica lo contrario, los términos "anticuerpo monoclonal", "mAb", "MAB" y "Mab" se usan indistintamente en el presente documento.

**[0019]** Además, aunque la invención se ilustra y describe a modo de referencia con el anticuerpo derivado de ser humano obtenido originalmente en los experimentos realizados de acuerdo con la presente invención y descritos en los ejemplos, debe entenderse que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención incluyen derivados sintéticos y biotecnológicos de un anticuerpo que se refiere a cualquier anticuerpo manipulado o molécula de unión a IL-32 similar a anticuerpo, sintetizado por técnicas químicas o recombinantes, que conserva una o más de las propiedades funcionales del anticuerpo sujeto, en particular su actividad neutralizante hacia IL-32. Por lo tanto, aunque la presente invención se puede describir por el bien de la concisión a modo de referencia a un anticuerpo, a menos que se indique lo contrario, los derivados sintéticos y biotecnológicos de los mismos, así como moléculas de unión a IL-32 equivalentes, se pretende también y se incluyen con el sentido del término anticuerpo.

### Breve descripción de los dibujos

20 **[0020]** Fig. 1: secuencias de aminoácidos de la región variable, es decir, la cadena pesada y la cadena ligera kappa/lambda (VH, VL) de anticuerpos específicos humanos contra IL-32 2C2 y 19A1 de la presente invención y anticuerpos de referencia 14B3 y 26A6. A: anticuerpo 2C2 (IgG3, lambda); B: anticuerpo 14B3 (IgG1, lambda); C: anticuerpo 19A1 (IgG1, lambda); D: anticuerpo 26A6 (IgG1, lambda). Regiones estructura (FR) y regiones determinantes de complementariedad (CDR) se indican con las CDRs subrayadas.

Fig. 2: Comparación de las seroactividades por ELISA de IL-32 $\alpha$  (diamantes rellenos) y IL-32 $\gamma$  (cuadrados rellenos) en sueros aislados de pacientes con APS1. El paciente individual se indica en el eje X y las mediciones DO450 de la unión a mAbs en el eje Y.

30 Fig. 3: Determinación por ELISA de EC50 de unión de anticuerpos anti-IL-32 de ejemplo 2C2, 14B3, 19A1 y 26A6 a A: IL-32 $\gamma$  (R & D) o B: IL-32 $\alpha$  (ImmunoTools). Todos los anticuerpos ensayados se unen con alta afinidad a IL-32 $\gamma$ . Anticuerpo 2C2 se une con una baja afinidad a IL-32 $\alpha$  también. Los anticuerpos restantes 14B3, 19A1 y 26A6 no muestran ninguna unión sustancial a IL-32 $\alpha$ .

35 Fig. 4: Características de unión y neutralización de anticuerpos de ejemplo de la invención. A: determinación por ELISA de EC50 de la unión de anticuerpo anti-IL-32 2C2 de ejemplo a IL-32 $\gamma$  (R & D) y IL-32 $\alpha$  (ImmunoTools), BSA se utilizó como control para la unión no específica. El anticuerpo 2C2 de ejemplo se une con alta afinidad a IL-32 $\gamma$  y con mucho menor afinidad a IL-32 $\alpha$ . B: La capacidad de neutralización de anticuerpos anti-IL-32 de ejemplo 2C2 y 40 19A1 de la actividad de IL-32 $\gamma$ .

Fig. 5: Mediciones de grosor de la oreja CytoEar calculadas como el número de cambios en relación con las mediciones del día 0, a continuación, se normalizaron a los controles pertinentes de PBS, para cada cohorte. Media +/- SEM, N indicado en la figura. Los valores de p obtenidos por prueba ANOVA de dos vías, ns (no significativo) = 45  $P > 0,05$ ; \* =  $P \leq 0,05$ ; \*\* =  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ , \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ . IP = inyección de anticuerpo intraperitoneal, ID = inyección intradérmica de la oreja.

Fig. 6: Mediciones de grosor de la oreja CytoEar que se muestran como valores absolutos (mm) para cada cohorte. Media +/- SEM, N indicado en la figura. Valores P obtenidos por la prueba ANOVA. IP = inyección de anticuerpo intraperitoneal, ID = inyección intradérmica de la oreja. Indicaciones de valor P como en la figura 5.

Fig. 7: Ensayo CytoEar - el seguimiento de peso. No se observaron cambios significativos de peso en ninguno de los animales ensayados en el experimento.

55 Fig. 8: Análisis detallado de los sensogramas relativos a la unión de IL-32 al anticuerpo anti-IL-32 2C2 de la presente invención. No se observó el comportamiento 1:1, lo que permite un mejor ajuste a un ligando heterogéneo. (A) gráficos superpuestos para el ajuste de Langmuir y los datos experimentales de la reacción de unión indican un buen ajuste a un modelo de Langmuir 1:1. IL-32 se inyectó en concentraciones de A1: 100 nM, A2: 33,33 nM, A3: 11,11 nM A4: 3,70 nM A5: 1,23 nM. Representación residual (B) muestra una dispersión aleatoria con la magnitud del nivel de ruido que indica un buen ajuste residual. (C) Tabla a continuación de las figuras muestran los parámetros cinéticos derivados de las curvas ajustadas para la asociación ( $k_a$ ), la disociación ( $k_d$ ),  $R_{max}$  y las constantes de disociación calculadas KD. KD de los anticuerpos anti-IL-32 2C2 de ejemplo de la presente invención parecen estar en el rango de nM.

65 Fig. 9: Efecto del anticuerpo de bloqueo 19A1 después de inflamación inducida por hIL-32 $\gamma$  en comparación con 2C2 en el ensayo CytoEar. Para inducir la inflamación por hIL-32 $\gamma$  se inyectó a una concentración de 6,25  $\mu\text{g/ml}$ , 125

ng/oreja. A: Línea de tiempo experimental de 10 días de ejemplo. B: Resumen del tratamiento experimental de los grupos de animales experimentales de A a F. C-F: cohortes de ratones (C57/BL6, de 8 semanas) se inyectaron IP con cantidades indicadas de anticuerpos 2C2 o 19A1 (o control IgG) en el día inicial del experimento, mientras que se inyectaron 125 ng de citocinas hIL-32 $\gamma$  en 20  $\mu$ l de PBS (o control PBS) por vía intradérmica en las orejas de ratones cada 48-72 horas. Las mediciones de grosor de la oreja se tomaron con un micrómetro digital Mitutoyo. Las mediciones de grosor de la oreja CytoEar calculadas como número de cambio en relación con mediciones del día inicial, entonces normalizaron a los controles pertinentes de PBS, para cada cohorte. Media  $\pm$  SEM, N indicado en la figura. Valores P obtenidos por la prueba ANOVA. IP = inyección intraperitoneal anticuerpo, ID = inyección intradérmica de la oreja, NT = control no tratado.

10

Fig. 10: Efecto de diferentes dosis de anticuerpo 19A1 después de la inflamación inducida por hIL-32 $\gamma$  en el ensayo CytoEar. Para inducir la inflamación hIL-32 $\gamma$  se inyectó a una concentración de 6.25 $\mu$ g/ml, 125 ng/oído. A: Ejemplar 10-día experimental línea de tiempo. B: Resumen del tratamiento experimental de los grupos de animales experimentales de A a K. CF: cohortes ratones (C57/BL6, de 8 semanas) eran IP inyecta con cantidades indicadas de 2C2 o 19A1 anticuerpos (o control IgG) en experimento día inicial, mientras 125 ng de citocinas hIL-32 $\gamma$  en 20  $\mu$ l de PBS (o control PBS) se inyectó por vía intradérmica en las orejas de ratones cada 48-72 horas. Mediciones de grosor de la oreja se tomaron con un micrómetro digital Mitutoyo. Mediciones CytoEar grosor de la oreja calculado como factor de cambio en relación con mediciones iniciales día, entonces normalizaron a los controles pertinentes de PBS, para cada cohorte. Media  $\pm$  SEM, N indica en la figura. P valores obtenidos por la prueba ANOVA IP = inyección intraperitoneal anticuerpo, ID = inyección intradérmica de la oreja, NT = control no tratado.

15

20

Fig. 11: Dosis dependencia de IL-32 en la inducción de la inflamación en el ensayo de CytoAnkle. Para inducir ratones inflamación obtiene inyecciones intraarticulares de tobillo de 10 l hIL-32 $\gamma$  en el tobillo derecho, mientras que el tobillo izquierdo fue inyectado con PBS. A: Ejemplar 13-día experimental línea de tiempo. B: Resumen del tratamiento experimental de las jaulas de los animales experimentales A1 a D2. CD: Mice cohorte (C57/BL6, de 8 semanas) eran IA inyecta con cantidades indicadas de hIL-32 $\gamma$  de citocinas en 10  $\mu$ l de PBS (o control PBS) en ratones tobillos cada 48-72 horas. Mediciones del espesor del tobillo axiales se tomaron con un micrómetro digital Mitutoyo. Mediciones CytoAnkle espesor calculado como factor de cambio en relación con mediciones iniciales día, entonces normalizaron a los controles pertinentes de PBS, para cada cohorte. Media  $\pm$  SEM, N indica en la figura. P valores obtenidos por la prueba ANOVA. IA = inyección intraarticular en el tobillo.

25

30

Fig. 12: Efecto de anticuerpos 2C2 después de inflamación inducida por hIL-32 $\gamma$  en el ensayo CytoAnkle. Prueba CytoAnkle:  $\pm$  IL-32 $\gamma$   $\pm$  2C2. A: línea de tiempo experimental de 10 días de ejemplo. B: Resumen del tratamiento experimental de las jaulas de los animales experimentales A1 a D2. CD: cohorte ratones (C57/BL6, de 8 semanas) eran IP inyectado con 200  $\mu$ g de 2C2 anticuerpos (o control IgG) en experimento día inicial, mientras que 500 ng de citocinas hIL-32 $\gamma$  en 10  $\mu$ l de PBS (o control PBS) era IA se inyectan en ratones tobillos cada 48-72 horas. Mediciones del espesor del tobillo axiales se tomaron con un micrómetro digital Mitutoyo. Mediciones CytoAnkle espesor calculado como factor de cambio en relación con mediciones iniciales día, entonces normalizaron a los controles pertinentes de PBS, para cada cohorte. Media  $\pm$  SEM, N indica en la figura. P valores obtenidos por la prueba ANOVA. IP = inyección de anticuerpo intraperitoneal, IA = inyección intraarticular en el tobillo.

35

40

### Descripción detallada de la invención

**[0021]** La presente invención se refiere en general a nuevas moléculas que se unen a IL-32 de mamífero, preferiblemente de origen humano, y en particular a anticuerpos monoclonales humanos, así como fragmentos, derivados y variantes de los mismos, tal como se caracteriza en las reivindicaciones que reconocen IL-32 $\gamma$ .

45

**[0022]** Ha habido ya esfuerzos para proporcionar anticuerpos específicos de IL-32, tal como se describe en la sección de antecedentes, sin embargo, los anticuerpos proporcionados y utilizados en la actualidad son, tal como se ha indicado anteriormente, de origen no humano, lo que perjudica en gran medida su uso terapéutico en los seres humanos debido a su inmunogenicidad. Además, aunque los anticuerpos murinos contra IL-32 $\alpha$  o de una especificidad más amplia contra varios isotipos de IL-32 están disponibles, pueden tener un perfil de efectos secundarios indeseables debido a su amplia especificidad de unión y potencialmente conducen por lo tanto a efectos adversos y enfermedades. Además, aparentemente no hay anticuerpos específicos de IL-32 $\gamma$  disponibles todavía.

50

**[0023]** Como se describe en los ejemplos, los anticuerpos objeto de la presente invención se aislaron mediante un procedimiento descrito en la solicitud internacional en trámite del solicitante WO 2013/098419 A1, basada en el cribado de los sueros de pacientes con una tolerancia central y/o periférica alterada o pérdida de auto-tolerancia, tales como los pacientes de APECED/APS1 para autoanticuerpos contra proteínas IL-32. Dentro de estos cribados, se realizó la sorprendente observación de que los autoanticuerpos que reconocen isotipos de IL-32 específicos estaban presentes en estos sueros. Esta citocina ha sido recientemente identificada como una citocina proinflamatoria, y todavía hay relativamente poco conocimiento sobre su papel en la enfermedad (al menos en comparación con muchas otras citocinas proinflamatorias). A este respecto, la presencia de autoanticuerpos contra IL-32 en pacientes de APS1, que no desarrollan muchas de las condiciones y enfermedades autoinmunes e inflamatorias comunes, tales como RA, presta más apoyo a un papel importante de esta citocina en la etiología de estas enfermedades y valida el enfoque de la presente invención, de su inhibición basada en anticuerpos dirigidos

60

65

para la intervención terapéutica, y su uso en aplicaciones de diagnóstico.

**[0024]** En vista de lo anterior, los experimentos realizados de acuerdo con la presente invención fueron dirigidos hacia la provisión de moléculas de unión a IL-32, en particular anticuerpos que muestran una especificidad de unión hacia todos los isotipos de IL-32, o sólo una subintervalo de subtipos de IL-32, o incluso sólo en contra de un isotipo singular, preferiblemente se unen específicamente a IL-32 $\gamma$  cuya inmunorreactividad se ha demostrado en pacientes con APECED/APS1 que proporciona protección contra la aparición de, por ejemplo, RA y/o IBD. Preferiblemente, las moléculas de unión a IL-32 son capaces de neutralizar una actividad biológica de IL-32. Tal como se ilustra por medio de los ejemplos de anticuerpo anti-IL-32 2C2 de la presente invención y ejemplos y figuras adjuntas, en particular, la Figura 3 y la Figura 4A, que muestra las afinidades de unión, la Fig. 4B y las Figs. 5, 6 y 9 a 12 que muestran la actividad neutralizante y utilidad terapéutica del anticuerpo sujeto en un modelo animal, se ha resuelto el problema subyacente de la presente invención.

**[0025]** Por consiguiente, en su aspecto más amplio, la presente invención se refiere a anticuerpos anti-interleucina-32 (IL-32) monoclonales humanos recombinantes y fragmentos de unión a IL-32 de los mismos, así como derivados biotecnológicos de los mismos que se unen a uno o más de los isotipos de IL-32, véase también la sección de antecedentes supra para una descripción de los isotipos de IL-32, incluyendo, por ejemplo, IL-32 $\gamma$ , IL-32 $\alpha$ , IL-32 $\beta$  y IL-32 $\delta$ , y que son capaces de neutralizar una actividad biológica de IL-32 $\gamma$ .

**[0026]** Según la presente invención, el anticuerpo anti-IL-32 monoclonal humano o fragmento de unión a IL-32 del mismo

(i) es capaz de unirse a IL-32 $\gamma$  (IL-32 $\gamma$ ) recombinante humano; y

(ii) es capaz de neutralizar una actividad biológica de IL-32 $\gamma$ , en la que la actividad biológica es la inflamación inducida por IL-32 $\gamma$  humana que se determina en un ensayo de inflamación de la oreja.

**[0027]** El anticuerpo o fragmento de unión a IL-32 del mismo de la presente invención comprende en su cadena pesada variable (VH) y cadena ligera variable (VL):

(a) las regiones determinantes complementarias (CDRs) VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3 y VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3 seleccionadas de:

(i)

VH-CDR1: posiciones 31-37 de la SEQ ID NO: 2

VH-CDR2: posiciones 52-67 de la SEQ ID NO: 2

VH-CDR3: posiciones 100-107 de la SEQ ID NO: 2

VL-CDR1: posiciones 23-35 de la SEQ ID NO: 4

35 VL-CDR2: posiciones 51-57 de SEQ ID NO: 4

VL-CDR3: posiciones 90-101 de la SEQ ID NO: 4; y

(ii)

VH-CDR1: posiciones 31-35 de la SEQ ID NO: 18

40 VH-CDR2: posiciones 50-66 de la SEQ ID NO: 18

VH-CDR3: posiciones 99-105 de la SEQ ID NO: 18

VL-CDR1: posiciones 23-33 de la SEQ ID NO: 20

VL-CDR2: posiciones 49-55 de la SEQ ID NO: 20

VL-CDR3: posiciones 88-97 de la SEQ ID NO: 20; y/o

45

(b) una secuencia de aminoácidos de la región V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub> establecida en la SEQ ID NO: 2 y 4, respectivamente, o SEQ ID NO: 18 y 20, respectivamente, o una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de identidad.

**[0028]** Tal como se describe en el presente documento a continuación con más detalle, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención pueden ser o derivar de cualquier tipo, clase o subclase de una molécula de inmunoglobulina. Sin embargo, en una realización preferida, se proporciona el anticuerpo de la presente invención, que es del isotipo IgG, lo más preferentemente de la subclase IgG1 o IgG3.

**[0029]** A fin de proporcionar tales anticuerpos humanizados, quiméricos y, en particular, completamente humanos y fragmentos de Fab nativos de los mismos, en una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a IL-32 de la presente invención comprende además una región constante C<sub>H</sub> y/o C<sub>L</sub> que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las secuencias de aminoácidos C<sub>H</sub> y C<sub>L</sub> expuestas en la Tabla 1 (SEQ ID NOs.: 6, 8, 14, 16, 22, 24 y 30) o una secuencia de aminoácidos con al menos 60 % de identidad, preferiblemente 70% de identidad, más preferiblemente 80% de identidad, aún más preferiblemente un 90% de identidad, y se prefiere particularmente al menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, de identidad con las secuencias de referencia mencionadas.

**[0030]** Como se describió anteriormente, se ha encontrado que la IL-32 induce la actividad proinflamatoria de diversas citocinas tales como TNFA/TNF-alfa, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, MIP-2 (ver Kim et al., (2005); Netea et (2005); Netea et al, (2008); Joosten et al, (2006), supra). Este mecanismo de activación se ha usado en la presente invención para el diseño de ensayos in vitro e in vivo para la determinación de actividad de IL-32, tal como la monitorización de la

expresión de IL-6 por macrófagos RAW 264.7 estimulados por IL-32 y el ensayo de inflamación de la oreja como se describió en el Ejemplo 3 y en las Figs. 4B, 5 y 6 para controlar las propiedades de neutralización de los anticuerpos de la presente invención. Como se describe en detalle en la misma, los anticuerpos de la presente invención se ha encontrado que tienen una potente actividad neutralizante hacia IL-32 $\gamma$ , en la que un anticuerpo también muestra

5 actividad de unión residual hacia IL-32 $\alpha$  como se especifica en detalle más adelante. De acuerdo con ello, el anticuerpo contra IL-32 o fragmento de unión del mismo de la presente invención es capaz de reducir la actividad biológica de IL-32 $\gamma$  humano, en el que la actividad biológica es la inflamación inducida por IL-32 $\gamma$  humano que se determina en un ensayo de inflamación de la oreja.

10 **[0031]** Además, las afinidades de unión de los anticuerpos de la presente invención han sido probadas por ELISA, tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, en el Ejemplo 2 y se muestra en las Figs. 3 y 4A. De acuerdo con los resultados de estos experimentos, la presente invención proporciona varios anticuerpos anti-IL-32 de ejemplo y fragmentos de unión a IL-32 de los mismos que muestran una afinidad de unión diferencial hacia

15 isotipos de IL-32 distintos, que ejemplifican las características de unión y de neutralización de las moléculas de unión a IL-32 proporcionadas en este documento.

**[0032]** Puesto que los anticuerpos anti-IL-32 de ejemplo descritos en los ejemplos se han derivado de un paciente humano, la presente invención proporciona ventajosamente anticuerpos completamente humanos particularmente útiles en aplicaciones terapéuticas, que están sustancialmente desprovistos de respuestas inmunológicas, de otro

20 modo típicamente observadas para anticuerpos exógenos, tales como para los anticuerpos derivados de ratón en seres humanos (respuesta HAMA) o humanizados y anticuerpos de tipo humano.

**[0033]** En este contexto, al contrario de los anticuerpos humanizados y en cualquier caso de anticuerpos de tipo humano, véase también la discusión a continuación, los anticuerpos de origen humano de la presente invención se

25 caracterizan por que comprenden CDR que se han observado por el cuerpo humano y por lo tanto están sustancialmente desprovistas del riesgo de ser inmunogénicas. Por lo tanto, el anticuerpo de la presente invención todavía se puede indicar derivado de humano si al menos una, preferiblemente dos y lo más preferiblemente las tres CDR de una o ambas de las cadenas ligera y pesada variable del anticuerpo derivan de los anticuerpos humanos ilustrados en el presente documento.

30 **[0034]** Los anticuerpos de origen humano también pueden ser llamados "auto-anticuerpos humanos" con el fin de destacar que esos anticuerpos de hecho se expresaron inicialmente por los sujetos y no son constructos seleccionados generados in vitro, por ejemplo, por medio de bibliotecas de fagos que expresan inmunoglobulina humana o anticuerpos xenogénicos generados en un animal transgénico que expresa parte del repertorio de

35 inmunoglobulina humana, que hasta ahora representaba el procedimiento más común para tratar de proporcionar anticuerpos de tipo humano. Por otro lado, el anticuerpo derivado de ser humano de la presente invención puede indicarse sintético, recombinante, y/o biotecnológico con el fin de distinguirlo de anticuerpos de suero humano per se, que se pueden purificar a través de la columna de proteína A o de afinidad.

40 **[0035]** Sin embargo, la presente invención utiliza y prevé más estudios de los anticuerpos de la presente invención en modelos animales, por ejemplo, en ratones transgénicos que expresan IL-32 humana. Para evitar efectos inmunogénicos en los animales experimentales análogos a la respuesta de HAMA en los seres humanos, en un aspecto, se proporciona el anticuerpo o fragmento de unión de la presente invención, que es un anticuerpo quimérico, preferiblemente un roedor-humano quimérico o un anticuerpo roederizado, más preferentemente un

45 murino-humano quimérico o un anticuerpo murinizado.

**[0036]** Como se mencionó anteriormente, los anticuerpos de la presente invención se han aislado de pacientes APECED/APS1. En este contexto, los experimentos descritos en la copendiente solicitud internacional del solicitante WO 2013/098419 A1 sorprendentemente revelaron que los pacientes APECED/APS1 muestran una auto-

50 inmunosome, es decir, un perfil de autoanticuerpos que comprende así un amplio espectro de moléculas de unión específicas para diferentes IL-32 isotipos. APS1 es una enfermedad autoinmune poco común causada por mutaciones en el gen autoinmune Regulador (AIRE). La proteína AIRE gobierna la expresión en el epitelio tímico medular de muchos autoantígenos periféricos (por ejemplo, insulina) que son presentados por MHC de tolerar los timocitos en desarrollo. En APS1, las mutaciones AIRE causan selección negativa aberrante, que permite a las

55 células T autorreactivas de escapar a la periferia. Por consiguiente, los pacientes muestran un espectro extremadamente variable de las características clínicas en APS1, pero por lo general con varios trastornos autoinmunes de tejidos endocrinos. La tríada APS1 definición comprende candidiasis mucocutánea crónica, hipoparatiroidismo e insuficiencia suprarrenal (Perheentupa, Endocrinol Metab. Clin North Am. 31 (2002), 295-320). Otras condiciones clínicas observadas en los pacientes de APECED incluyen enfermedades autoinmunes de

60 la tiroides, diabetes mellitus, insuficiencia gonadal, vitiligo, alopecia, hepatitis crónica, gastritis crónica y la anemia perniciosa y diferentes formas de otros síntomas gastrointestinales. Para más detalles sobre los pacientes APECED/APS1 y la proyección de su auto-inmunosome ver la descripción de la solicitud internacional WO 2013/098419 A1 y los ejemplos descritos en el mismo, en particular la sección Material y procedimientos en las páginas 112-117; Ejemplo 1 en las páginas 117-118 y en el Ejemplo 7 en la página 128 y las siguientes Tablas 1 a

65 14; y el Ejemplo 17 en las páginas 168-171.



- [0037]** Como se describe anteriormente, en una realización preferida, el anticuerpo de la presente invención se obtiene o puede obtenerse a partir de una muestra de un sujeto humano afectado con poliendocrinopatía autoinmune-candidiasis-distrofia ectodérmica (APECED/APS1) o de un paciente afectado con una enfermedad autoinmune similar a la descrita en la solicitud internacional WO 2013/098419 A1 y de los ejemplos 5 en la misma, en particular la sección Materiales y Procedimientos en las páginas 112-117; Ejemplo 1 en las páginas 117-118; en el Ejemplo 10 en las páginas 156-161, específicamente en la sección "Pacientes y controles" en la página 156 en la misma; y el Ejemplo 17 en las páginas 168-171. Además, en una realización preferida, el sujeto APS1 se caracteriza por mostrar serorreactividad contra la IL-32 humana, preferiblemente contra IL-32 $\gamma$  y/o IL-32 $\alpha$ .
- 10 **[0038]** En este contexto se observa que los anticuerpos anti-IL-32 objeto de la presente invención se han clonado mediante un procedimiento nuevo y patentado de aislar anticuerpos humanos, que se describe en la solicitud internacional en trámite del solicitante WO 2013/098420 A1.
- [0039]** En resumen, la muestra para aislar el anticuerpo de interés comprende o consiste en células 15 mononucleares de sangre periférica (PBMC) y suero para la detección de posibles reactividades de anticuerpos. La muestra derivada del sujeto o bien se puede utilizar directamente para, por ejemplo, las pruebas de serorreactividad contra uno o más del antígeno deseado(s) o puede ser procesado adicionalmente, por ejemplo enriquecido para los linfocitos B. En particular, se prefiere que los comprende de muestra o se deriva de las células B que producen el anticuerpo de interés, lo más preferiblemente células B de memoria. Las células B de memoria se cultivan bajo 20 condiciones que permiten solamente una duración de vida definida de las células B, típicamente no más de 1 a 2 semanas hasta que señalar a las células de cultivos de células B que son reactivos contra la deseada antígeno posteriormente seguido por RT-PCR de solo las células para obtener el repertorio de genes de inmunoglobulina ordenadas; ver por Descripción de ejemplos detallados 1 y 2 en las páginas 118 a 120 del documento WO 2013/098419 A1 y en los Ejemplos particular de 1 a 4 de las páginas 27 a 31 del documento WO 2013/0984220 25 A1. Naturalmente, la presente invención se extiende a la célula de linfocitos y B de memoria B humana, respectivamente, que produce el anticuerpo que tiene las características distintas y únicas como se define aquí arriba y abajo.
- [0040]** Por lo tanto, además de utilizar un grupo de pacientes seleccionado, preferiblemente un sujeto APS1 30 caracteriza por mostrar serorreactividad contra al menos una de la IL-32 isotipos neutralizado por un anticuerpo ejemplar de la presente invención, los anticuerpos anti-IL-32 han sido proporcionado por el empleo de un procedimiento particular específicamente desarrollado y adaptado para el aislamiento de anticuerpos monoclonales humanos a partir de células B de pacientes con una enfermedad autoinmune como los pacientes APECED/APS1.
- 35 **[0041]** En una realización, la molécula del anticuerpo o IL-32 de unión de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos de la región V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub> representada en el SEQ ID NOs: 2 y 4 o 18 y 20 muestran en Figura 1 o como la codificada por los ácidos nucleicos correspondientes, como se indica en la Tabla 1. La presente solicitud describe un anticuerpo anti-IL-32 o molécula de unión a IL-32, que compite con un anticuerpo de la 40 presente invención tal como se define anteriormente en esta memoria para la unión específica a humano IL-32, preferiblemente a IL-32 $\gamma$ . En particular, se proporcionan anti-IL-32 anticuerpos que demuestran las características de unión inmunológicas y/o propiedades biológicas tal como se describe para los anticuerpos ilustra en los ejemplos y en las figuras. Cuando está presente, el término "características de unión inmunológicas", u otras características de unión de un anticuerpo con un antígeno, en todas sus formas gramaticales, se refieren a la especificidad, afinidad, reactividad cruzada, y otras características de unión de un anticuerpo.
- 45 **[0042]** En una realización, el anticuerpo de la presente invención es un fragmento de anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención se pueden seleccionar del grupo que consiste de un fragmento F<sub>v</sub> de cadena única (scFv), un F(ab')<sub>1</sub>, un fragmento F(ab), y un fragmento F(ab')<sub>2</sub>.
- 50 **[0043]** Una ventaja adicional de los anticuerpos de la presente invención es que debido al hecho de que la respuesta inmunitaria humoral ha sido provocada contra el antígeno nativo en su fisiológico y medio celular, típicamente autoanticuerpos se producen y pueden ser aislados que reconocen un conformacional epítipo del antígeno debido a su presentación en contexto por ejemplo, con otros componentes celulares, presentación en una membrana de la superficie celular y/o la unión a un receptor. Por el contrario, los procedimientos convencionales de 55 generación de anticuerpos monoclonales tales como anticuerpos monoclonales de ratón, versiones humanizadas de los mismos o anticuerpos obtenidos a partir de presentación de fagos típicamente emplean un fragmento antigénico de la proteína diana para la inmunización de un mamífero no humano y la detección, respectivamente, sobre los que se obtienen por lo general los anticuerpos que reconocen epítipos lineales o epítipos conformacionales limitados a una estructura de dos dimensiones del inmunógeno en lugar de la presencia de la proteína nativa en su contexto 60 fisiológico y celular. En consecuencia, es prudente esperar que los autoanticuerpos de la presente invención son únicos en cuanto a su especificidad de epítipo. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a anticuerpos y como vinculante moléculas que exhiben sustancialmente la misma especificidad de unión que los autoanticuerpos aislados de acuerdo con el procedimiento de la presente invención. Tales anticuerpos pueden ser probados fácilmente mediante, por ejemplo, ELISA competitivo o más apropiadamente en un ensayo de neutralización basado 65 en células usando un autoanticuerpo y un derivado monoclonal, respectivamente, del mismo de la presente invención como un anticuerpo de referencia y los ensayos inmunológicos descritos en los ejemplos o conocidos de

otro modo para la persona experta en la técnica.

**[0044]** La presente invención se ejemplifica IL-32 moléculas de unión, es decir, anticuerpos y fragmentos de unión de los mismos que pueden ser generalmente caracterizada por que comprende, en su región variable, es decir, dominio de unión de al menos las regiones determinantes complementarias (CDRs) de la  $V_H$  y  $V_L$  de la región variable que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 1 de ( $V_H$ ) (SEQ ID NOs: 2 y 18) y ( $V_L$ ) (SEQ ID NOs: 4 y 20) - ver las secuencias de CDR ejemplares subrayados en la Fig. 1 e identificado en la Tabla 1. Sin embargo, como se discute en la siguiente en la persona experta en la técnica es bien consciente del hecho de que, además o alternativamente se pueden usar CDRs, que difieren en su secuencia de aminoácidos de los indicados en la figura. 1 por uno, dos, tres o incluso más aminoácidos, en particular en caso de CDR2 y CDR3.

**[0045]** Como se ha demostrado más de los anticuerpos de la presente invención, son capaces de neutralizar la actividad biológica de su proteína diana; véase, por ejemplo, los resultados del ensayo de neutralización de IL-6 descrito en el Ejemplo 3, la Fig. 4B y IL-32 ensayo de inflamación de la oreja (ensayo CytoEar) y el ensayo de inflamación del tobillo (ensayo CytoAnkle) descrito en el Ejemplo 4, Figs. 5 y 6, así como las Figs. 9 a 12. En este contexto, el término "neutralizar" significa que el anticuerpo anti-IL-32 o IL-32 fragmento de unión del mismo de la presente invención es capaz de intervenir con la actividad biológica de su proteína diana en una bioquímico, celular basado o ensayo in vivo como puede ser evaluado por la realización del ensayo respectivo en presencia del anticuerpo objeto de la presente invención, en el que la actividad biológica de la proteína diana se reduce de forma concomitante con el aumento de nivel del anticuerpo de la presente invención se somete a el ensayo de comparación con la actividad biológica de la proteína sin la presencia del anticuerpo de la presente invención y en presencia de un compuesto, por ejemplo, un anticuerpo de control que se sabe que dejar la actividad biológica de la proteína diana no afectado en especie. Tal bioquímica, in vitro y ensayo in vivo basado en también puede realizarse usando un anticuerpo de referencia conocido por ser capaz de neutralizar la actividad biológica de la proteína diana, tal como se ha demostrado para los anti IL-32 anticuerpos de la presente invención y someter el anticuerpo candidato para la muestra de ensayo, en el que o bien un efecto neutralizante aditivo puede observarse que resulta de la actividad combinada del anticuerpo de referencia y candidato o una competición del anticuerpo anticuerpo candidato y de referencia se observa que se puede determinar mediante el etiquetado de cualquiera de los dos anticuerpos. Por lo tanto, en una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo obtenido por el procedimiento de la presente invención es capaz de neutralizar la actividad biológica de su antígeno, por ejemplo, al menos un humano IL-32 isotipo, preferiblemente de IL-32 $\gamma$ . El efecto neutralizante puede ser evaluada, por ejemplo, en los términos de la cantidad en que se reduce la actividad de IL-32 o por el tiempo, a la que se puede observar una reducción tal después de la introducción de las moléculas de unión IL-32 de la presente invención, o, por supuesto, en los términos combinados de ambos.

**[0046]** Los anticuerpos o antígeno fragmentos de unión, por ejemplo, péptidos, pueden proporcionarse polipéptidos o proteínas de fusión de la presente invención, como se indica en detalle a continuación, mediante la expresión en una célula huésped o en un sistema de traducción libre de células in vitro, por ejemplo. Para expresar el péptido, polipéptido o proteína de fusión en una célula huésped, la codificación molécula de ácido nucleico dicho péptido, polipéptido o proteína de fusión pueden insertarse en el vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia de codificación insertada. Procedimientos que son bien conocidos para los expertos en la técnica pueden ser usados para vectores de expresión de construcción que contiene secuencias que codifican un polipéptido de interés y la transcripción apropiada y elementos de control de la traducción. Estos procedimientos incluyen técnicas in vitro de ADN recombinante, técnicas sintéticas, y recombinación genética in vivo. Tales técnicas se describen en Sambrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989), y Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology (1989); véase también las secciones "polinucleótidos" y "expresiones" más abajo y la literatura citadas en la sección de Ejemplos para más detalles a este respecto.

**[0047]** Una célula huésped adecuada para la expresión del producto puede ser cualquier célula procariota o eucariota; por ejemplo, células bacterianas tales como E. coli o B. subtilis, células de insecto (baculovirus), células de levadura, célula vegetal o una célula animal. Para el procesamiento eficiente, sin embargo, se prefieren células de mamífero. Líneas celulares de mamífero típicas útiles para este propósito incluyen células CHO, células HEK 293, células COS y células NSO.

**[0048]** Los anticuerpos aislados de la presente invención pueden, por supuesto, no se puede aplicar como tal a un paciente, pero generalmente tienen que ser formuladas farmacéuticamente para asegurar, por ejemplo, su estabilidad, aceptabilidad y la biodisponibilidad en el paciente. Por lo tanto, en una realización, se proporciona el procedimiento de la presente invención, que comprende además la etapa de mezclar el anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento del mismo con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables se describen en detalle más adelante.

**[0049]** Como una medida para obtener una estable y permanente fuente de moléculas de la presente invención la unión, los genes heterólogos que codifican estas moléculas de unión se pueden aislar mediante clonación directa, amplificación por PCR, o síntesis artificial y se introduce y se expresa en células huésped adecuadas u organismos.

**[0050]** Las células huésped como se describe en el presente documento se pueden utilizar, así como en el procedimiento anterior y como se describe en detalle en la sección "Host" de esta especificación. A este respecto, en una realización se proporciona el procedimiento anterior, donde el huésped de expresión es una célula de levadura, una célula vegetal o una célula animal.

5

**[0051]** Como se demostró en los Ejemplos adjuntos 2 y 3 y se resumen en la Tabla 3, las moléculas de unión, es decir, los anticuerpos se han identificado y clonado, que muestran una afinidad particularmente elevada de unión aparente (EC50/ED50) para la IL-32 humana. A este respecto, en una realización de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo es como se define anteriormente en este documento está provisto de una alta afinidad para su respectiva molécula diana, por ejemplo, IL-32 humana isotipos como se define anteriormente en esta memoria, preferentemente para IL-32 $\gamma$ , que muestra un EC50 a concentraciones por debajo de 2,000 ng/ml o 1.500 ng/ml, preferiblemente por debajo de 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 o 100 ng/ml y más preferiblemente por debajo de 50, 20 o 10 ng/ml. Alternativamente, o además, en una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo como se define anteriormente en este documento se proporciona con alta capacidad de neutralización para un humano IL-32 isotipo, preferiblemente para IL-32 $\gamma$ , mostrando IC50 en concentraciones inferiores a 500 o 400 ng/ml, preferiblemente por debajo de 300, 200 o 100 ng/ml, más preferiblemente por debajo de 50, 20 o 10 ng/ml. Para más detalles con respecto a la afinidad de unión de los anticuerpos de la presente invención véase, por ejemplo, la sección de "características de unión" más adelante. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a IL-32 de la presente invención se une específicamente más de una IL-32 de isotipo, preferiblemente en el que IL-32 $\gamma$  es uno de los isotipos reconocidos. En una realización, el segundo isotipo es IL-32 $\alpha$ . En una realización preferida, el anticuerpo anti-IL-32 o IL-32 fragmento de unión del mismo preferiblemente se une a IL-32 $\gamma$  sobre el isotipo segunda reconocido. Además, en una realización, el anticuerpo anti-IL-32 o IL-32 fragmento de unión al mismo de la presente invención se une a una IL-32 de isotipo y no, o no sustancialmente bind cualquier otro IL-32 de isotipo.

25

**[0052]** La presente invención también se refiere a polinucleótidos que codifican al menos una región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención. Dicha región comprende variables al menos las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de la  $V_H$  y  $V_L$  de la región variable como sucesivamente conjunto en SEQ ID NOS: 2 y 4 o 18 y 20 muestran en la Figura 1.

30

**[0053]** En caso de una secuencia derivada, dicha secuencia muestra al menos 60% de identidad, más preferiblemente (en el siguiente orden) al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90 %, y lo más preferiblemente 95%, al menos 96-99%, o incluso 100% de identidad con una secuencia del grupo que consiste en las secuencias anteriormente mencionado y se identificó en el Listado de secuencias. El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que necesitan ser introducida para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr utilizando un algoritmo matemático, que es bien conocido por los expertos en la técnica. Las identidades se hace referencia en el presente documento han de ser determinado mediante el uso de los programas BLAST que se refiere además a infra el presente documento. Como se mencionó anteriormente, en una realización preferida, la presente invención se refiere a anticuerpos sustancialmente completamente humanos, preferiblemente IgG que incluye al menos la cadena pesada constante I ( $C_H1$ ) y la correspondiente cadena ligera de la región constante, es decir,  $\gamma$ -1,  $\gamma$ - 2,  $\gamma$ -3 o  $\gamma$ -4 en combinación con  $\lambda$  o  $\kappa$ . En una realización particularmente preferida, los nucleótidos y secuencias de aminoácidos de las regiones constantes aisladas por los anticuerpos sujetos ilustrados en los Ejemplos se utilizan como se representa en la Tabla 1 a continuación y en SEQ ID NOS: 5, 7, 13, 15, 21, 23 y 29 con respecto a las secuencias de nucleótidos y/o SEQ ID NO: 6, 8, 14, 16, 22, 24 y 30 con respecto a las secuencias de amino ácido o amino secuencias de ácido con al menos 60% de identidad con éstos referenciado antes.

**[0054]** De acuerdo con lo anterior, en una realización, la presente invención también proporciona un polinucleótido que codifica al menos la región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención. Típicamente, dicha región variable codificada por el polinucleótido comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la  $V_H$  y/o  $V_L$  de la región variable de dicho anticuerpo. Variables y constantes regiones de anticuerpos se describen con más detalle en la sección "estructura IgG" a continuación. En una realización preferida de la presente invención, los polinucleótidos comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un ácido nucleico que tiene una secuencia de polinucleótido que codifica el  $V_H$  o  $V_L$  región de un anticuerpo de la presente invención como se representa en la Tabla 1 a continuación. A este respecto, la persona experta en la técnica apreciará fácilmente que los polinucleótidos que codifican al menos el dominio variable de la luz y/o de la cadena pesada puede codificar el dominio variable de cualquiera de las cadenas de inmunoglobulina o sólo uno de ellos. En una realización preferida, el polinucleótido codifica el anticuerpo anti-IL-32 o fragmento de unión a IL-32 del mismo como se ha definido anteriormente.

Tabla 1: secuencias de nucleótidos de las regiones variables y constantes ( $V_H$ ,  $V_L$ ,  $C_H$ ,  $C_L$ ) regiones de anticuerpo 2C2 específico de IL-32, IgG3,  $\lambda$ , y de anticuerpo 19A1 específico de IL32-, IgG1,  $\lambda$  de la presente invención y de anticuerpos de referencia 14B3 y 26A6. Los nucleótidos o aminoácidos subrayados, en negrita indican las regiones de codificación CDR en la secuencia de cadena variable. Los nucleótidos o aminoácidos

65

subrayados, en cursiva indican secuencias que no han sido secuenciadas, pero son obtenidas a partir de la base de datos. En las cadenas constantes, tales regiones están alineados con y se ajustan de acuerdo con las secuencias de la región variable de línea germinal humana pertinentes en la base de datos; véase, por ejemplo, Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk>) del MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, Reino Unido)

5

10	<b>Anticuerpo</b>	Secuencia de nucléotidos y aminoácidos de cadenas pesada variable (VH) y ligera variable (VL), pesada constante (CH) y ligera constante (CL)
15	2C2-V <sub>H</sub>	<p>cagctgcggggtgcaggagtgcggcccaggactggtgaagcctgcggagacgctgtc  cctcacctgcagtgctctctagtggctccgtcagc<aatagtcggttattactgggccc< a="">  ggatccgccagtcgccaggaagggaactggagtggattggg<del>agtatgtattatcgt</del>  <del>gggaggtcctactacaaccgctccctcaagagt</del>cgcctcaccatttcgattgacac  gtccaagaatcagttctccctgaaactgacctctctgaccgccgacacagggcg  tctattattgtgccgca<del>gcagtttatcaccgaccttgactac</del>tggggccaggaacc  ctggtcaccgtctctctca SEQ ID NO:1</aatagtcggttattactgggccc<></p>
20	2C2-V <sub>H</sub>	<p>QLRVQESGPGLLKPAETLSLTCSVSSGSVS<del>NSRYYWAWIRQSPGKLEWIGSMYYR</del>  <del>GRSYNPSLKS</del>RRLTISIDTSKNQFSLKLTSLTAADTAVYYCAA<del>AVYHLDLY</del>WGQGT  LVTVSS SEQ ID NO:2</p>
25	2C2-V <sub>L</sub> tipo lambda	<p>cagtctgtggttgacgcagccgcctcagtgctctgcccaggacagaagggtcac  catctcctgc<del>tctggaagcggtccagcattgggaacaattatgtctcc</del>tgggtacc  agcaactcccaggagcagccccaaactcctcatttat<del>gacaataactaagcagccc</del>  <del>tcagggattcctgaccgattctctggtccaaagtctggcaegtccagccacctggc</del>  catcaccggactccaacctggggacgcccggcattattactgc<del>ggaacatgggata</del>  <del>gtagtttcagtgttttttgggta</del>attcggcggagggaaccaagctgaccgtccta  SEQ ID NO:3</p>
35	2C2-V <sub>L</sub> tipo lambda	<p>QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC<del>SGSGSSIGNNYVS</del>WYQQLPGAAPKLLIY<del>DNTRP</del>  <del>SGIPDRFSGSKSGTSATLAI</del>TGLQPGDAADYY<del>GTWDS</del>SFVFWVFGGGTKLTVL  SEQ ID NO:4</p>

5	2C2-C <sub>H</sub>	<p>gcttccaccaagggcccacatcggtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctc  tgggggacacagcgccctgggctgctggtcaaggactacttccccgaaccgggtga  cgggtgctggtggaactcaggcgccctgaccagcggtgacacacttcccggctgctc  ctacagtcctcaggactctactccctcagcagcggtggtgaccgtgcccctccagcag  cttggggaccagacctacacctgcaactggaatcacaagcccagcaacaccaagg  tggacaagagagttgagctcaaaaccccacttgggtgacacaactcacacatgccca  cgggtgccagagcccacaaatcttgtgacacacctccccctgcccacgggtgccaga  gcccacaaatcttgtgacacacctccccatgcccacgggtgccagagcccacaaatctt  gtgacacacctccccctgcccacgggtgccagcactgaactcctgggaggaccg  tcagtcctcctcttcccccaaaacccaaggatacccttatgatttcccggacccc  tgaggtcacgtgctggtggtggacgtgagccacgaagaccccaggggtccagttca  agtggtagctggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaagctgctgggaggag  cagtacaacagcagcttccgtggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactg  gctgaacggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccca  tcgagaaaaccatctccaaaaccaaaggacagccccgagaaccacaggtgtacacc  ctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggt  caaaggcttctaccccagcagacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccgg  agaacaactacaacaccagcctcccatgctggactccgacggctccttcttctctc  tacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacatcttctcatg  ctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccgctacacgcagaagagcctctcctgt  ctccgggtaaatga</p> <p style="text-align: right;">SEQ ID NO:5</p>
30	2C2-C <sub>H</sub>	<p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV  LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTHTTCP  RCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGP  SVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKLREE  QYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYIT  LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYNTTPPMLDSGDSFFL  YSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHREALHNRYTQKSLSLSPGK</p> <p style="text-align: right;">SEQ ID NO:6</p>
40	2C2-C <sub>L</sub> tipo lambda	<p>agtcagcccagggtgccccctcggtcactctgttcccgcctcctctgaggagct  tcaagccaacaaggccacactgggtgtgtctcataagtgacttctacccgggagccg  tgacagtgccctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcgggagtgagaccacc  acacctccaacaaagcaacaacaagtacgcgccagcagctacctgagcctgac  gcctgagcagtggaagtcccacaaaagctacagctgccaggtcaca<del>catgaagggg</del>  <del>gcaccgtggagaagacagtgggcccctacagaatggtcatag</del></p> <p style="text-align: right;">SEQ ID NO:7</p>
45	2C2-C <sub>L</sub> tipo lambda	<p>SQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETT  TPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS HKSYSCQVT</p> <p style="text-align: right;"><u>HEGSTVEKTVAPTECS</u> SEQ ID NO:8</p>
50	14B3-V <sub>H</sub>	<p>cagggtgcagctggtggagtctgggggagggcgtggtccagcctgggaggtccctgag  actctcctgtgtagcgtctggactcactttcagg<del>acctatggcatgcac</del>tgggtcc  gccaggctccaggcaacgggctggagtgggtggca<del>atcatatggcatgatggtaat</del>  <del>aaaaataactatgcagactccgtaaagggc</del>cgattcaccatctccagggacaattc  caagaacagctctatatctccaaatgaacagcctgagagctcagggacacggctgtgt  attactgtgcgaga<del>gaaatgaaatggcatcgacgtc</del>tggggccaagggaccacggtc  accgtctcctca</p> <p style="text-align: right;">SEQ ID NO:9</p>
60	14B3-V <sub>H</sub>	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGLTFR</p> <p style="text-align: right;"><u>TYGMH</u>WVRQAPNGLEWVA<u>I</u>IWHDGN <u>KKYYADSVKGR</u>RFTISRDN SKNSLYLQMN SLRVEDTAVYYCARE<u>EMNGIDV</u>WGQGTTV TVSS</p> <p style="text-align: right;">SEQ ID NO:10</p>

ES 2 768 335 T3

<p>5</p> <p>14B3-V<sub>L</sub> tipo lambda</p>	<p>tcctatgagctgacccagccaccctcggtgtcagtggtcccaggacaaaacggccag gatcacctgc<u>tctggagatgCGTTGCCAGAAACATATGTTTAT</u>tggtagaccagcaga agtcaggccagggcccctgtgaagctcatctat<u>gaggacagcgaacgaccctcc</u>ggg atccctgagagattctctggctccagctcagggacattggccaccttgactatcag tggggcccctgtggaggatgaagctgactactactgt<u>tactcaacagacagtagtg</u> <u>gtatcgggggtg</u>ttcggaggagggaaccaagctgaccgtccta SEQ ID NO:11</p>
<p>10</p> <p>14B3-V<sub>L</sub> tipo lambda</p>	<p>SYELTQPPSVSVSPGQTARITC<u>SGDALPETYVY</u>WYQQKSGQAPVKLIY<u>EDSERPSG</u> I PERFSGSSSGTLATLTISGAHVEDEADYYC<u>YSTDSSGIGV</u>FGGGKLTIVL SEQ ID NO:12</p>
<p>15</p> <p>20</p> <p>25</p> <p>30</p> <p>35</p> <p>14B3-C<sub>H</sub></p>	<p>gcctccaaccaagggcccctcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctc tgggggacacagcgcccctgggctgctgggtcaaggactacttccccgaaccgggta cgggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcaacacctccccggctgtc ctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcag cttggggaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagg tggacaagagagttgagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgc ccagcacctgaactcctggggggaccgtcagctcttctcttccccccaaaaccaa ggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtgggtggtagctga gccacgaagaccctgagggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggagggtgat aatgccaaagacaaagccgcgaggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtgggtcag cgtcctcaccgtcctgcaccaggactgggtgaatggcaaggagtacaagtgaagg tctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaacatctccaaagccaaagg cagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatccccgggaggagatgacc gaaccagggtcagcctgacctgctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc tggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctccccgtg ctggactccgacggctccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcag gtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgatgaggctctgcacaacc actacacgcagaagagcctctcctgtccccgggtaaatga SEQ ID NO:13</p>
<p>40</p> <p>45</p> <p>14B3-C<sub>H</sub></p>	<p>ASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO:14</p>
<p>50</p> <p>14B3-C<sub>L</sub> tipo lambda</p>	<p>agtcagcccaaggctgccccctcggtcactctgttccccgcccctcctctgaggagct tcaagccaacaaggccacactgggtgtgtctcataagtgacttctaccggggagccg tgacagtgccctggaaggcagatagcagcccgtcaaggcgggagtgagaccacc acaccctccaacaaagcaacaacaagtagcggccagcagctacctgagcctgac gcctgagcagtggaagtcccacaaaagctacagctgccagggtcacacatgaagggg <u>gcaccgtggagaagacagtgggcccctacagaatgttcatag</u> SEQ ID NO:15</p>
<p>55</p> <p>14B3-C<sub>L</sub> tipo lambda</p>	<p>SQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETT TPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKYSYSCQVT<u>HEGSTVEKTVAPTECS</u> SEQ ID NO:16</p>

ES 2 768 335 T3

<p>5</p> <p>19A1-V<sub>H</sub></p>	<p>caggtgcacctggtggagtctgggggagggcgtggtccagcctgggaggtccctgag  actctcctgtgtcgcgtctggactcactttcagg<u>acctatggcatgcac</u>tgggtcc  gccaggtccaggcaacgggctggagtgggtggca<u>attatatggcatgatggtaat</u>  <u>aaaaatactatgcagactccgtaaagggc</u>cgattcaccatctccagggacaattc  caagaacagtctatatctccaaatgaacagcctgagagtcgaggacacggctgtgt  attactgtgcgagag<u>gaaatgaaatggcatcgacgtc</u>tggggccaagggaccacggtc  accgtctcctca SEQ ID NO:17</p>
<p>15</p> <p>19A1-V<sub>H</sub></p>	<p>QVHLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGLTFR<u>TYGMH</u>WVRQAPGNGLWVA<u>IIWHDGN</u>  <u>KKYYADSVKGR</u>FTISRDNKNSLYLQMNLSRVEDTAVYYCARE<u>EMNGIDV</u>WGQTTV  TVSS SEQ ID NO:18</p>
<p>20</p> <p>19A1-V<sub>I</sub>  tipo lambda</p>	<p>tcctatgagctgacctcagccaccctcggtgtcagtggtccccaggacaaacggccag  gatcacctgc<u>tctggagatgcttggcagaaacatagtttat</u>tggtagcagcaga  agtcaggccaggcccctgtgaagctcatctat<u>gaggacagcgaacgacctcc</u>ggg  atccctgagagattctctggctccagctcagggacattggccaccttgactatcag  tggggcccattgtggaggatgaagctgactactactgt<u>tactcaacagacagtagtg</u>  <u>gtatcgggggtg</u>ttcggaggagggaccaagctgaccgtccta SEQ ID NO:19</p>
<p>25</p> <p>19A1-V<sub>L</sub>  tipo lambda</p>	<p>SYELTQPPSVSVSPGQTARITC<u>SGDALPETVYV</u>WYQQKSGQAPVKLIY<u>EDSERPSG</u>  IPERFSGSSSGLTLATLTISGAHVEDEADYYC<u>YSTDSSGIGV</u>FGGGTKLTVL  SEQ ID NO:20</p>
<p>30</p> <p>35</p> <p>40</p> <p>45</p> <p>19A1-C<sub>H</sub></p>	<p>gcctccaccaagggcccattcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctc  tgggggcacagcggcccctgggtgctcctgggcaaggactactccccgaaccgggtga  cgggtgctcgtggaactcagggcgcctgaccagcggcgtgcacacctccccggtgtc  ctacagtcctcaggactctactcctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcag  cttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagg  tggaacaagagagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgc  ccagcacctgaactcctggggggaccgtcagctctcctcttccccccaaaacccaa  ggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggagcgtga  gccacgaagaccctgaggtcaagtcaactggtaactggcagcggcgtggaggtgat  aatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtaaacagcagcgtaccgtgtggtcag  cgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaagg  tctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaacatctccaagccaaaggg  cagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaa  gaaccaggtcagcctgacctgctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccg  tggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtg  ctggactccgacggctccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcag  gtggcagcaggggaacgtcttctctatgctccgtgatgcatgaggetctgcacaacc  actacacgcagaagagcctctccctgtccccgggtaaatga SEQ ID NO:21</p>
<p>50</p> <p>55</p> <p>19A1-C<sub>H</sub></p>	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV  LQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPC  PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH  NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKG  QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV  LSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  SEQ ID NO:22</p>

5	19A1-C <sub>L</sub> tipo lambda :	agtcagcccaaggctgccccctcgggtcactctgttcccgcctcctctgaggagct tcaagccaacaaggccaactggtgtgtctcataagtgacttctaccgggagccg tgacagtggcctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcgggagtgagaccacc acaccctccaacaagcaacaacaagtacgcggccagcagctacctgagcctgac gcctgagcagtggaagtcccacaaaagctacagctgccaggtcaca <u>catgaagggg</u> <u>gcaccgtggagaagacagtgggccccctacagaatgttcatag</u> SEQ ID NO:23
10	19A1-C <sub>L</sub> tipo lambda	SQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETT TPSKQSNKYAASSYLSTPEQWKSHKSYSCQVT <u>HEGSTVEKTVAPTECS</u> SEQ ID NO:24
15	26A6-V <sub>H</sub>	cagggtcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgag actctcctgtgtagcgtctggactcactttcagg <u>acctatggcatgcac</u> tgggtcc gccaggtccaggcaacgggctggagtgggtggca <u>atcatatggcatgatggtaat</u> <u>aaaaataactttgctgactccgtaaagggc</u> cgattcaccatctccagggacaattc caagaacagtctatatctccaaatgaacagcctgagagtcgaggacacggctgttt attactgtgcgaga <u>gaaatgaaaggcatcgacgtc</u> tggggccaagggaccacggctc accgtctcctca SEQ ID NO:25
25	26A6-V <sub>H</sub>	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRSLCVASGLTFR <u>TYGMHWVRQAPGNGLWVAIIWHDGN</u> <u>KKYFADSVKGR</u> FTISRDNKNSLYLQMNSLRVEDTAVYYCARE <u>EMNGIDV</u> WGQGTTV TVSS SEQ ID NO:26
30	26A6-V <sub>L</sub> tipo lambda	tcctatgagctgaccagccaccctcgggtgtcagtggtccccaggacaacggccag gatcacctgc <u>tctggagatgcggttgccagaacaatagtttat</u> tggtagcagcaga agtcaggccaggccccctgtgaagctcatctat <u>gaggacagcgaacgacctcc</u> ggg atccctgagagattctctggctccagctcaggacattggccacctgactatcag tggggcccatgtggaggatgaagctgactactactgt <u>tactcaacagacagtagtg</u> <u>gtatcgggggtg</u> tccggaggagggaccaaggtgaccgtccta SEQ ID NO:27
35	26A6-V <sub>L</sub> tipo lambda	SYELTQPPSVSVSPGQTARITC <u>SGDALPETVYVY</u> WYQKSGQAPVKLIY <u>EDSERPSG</u> I PERFSGSSSGLATLTISGAHVEDEADYCY <u>YSTDSSGIGV</u> FGGGTKVTVL SEQ ID NO:28
40	26A6-C <sub>L</sub> tipo lambda :	agtcagcccaaggctgccccctcgggtcactctgttcccgcctcctctgaggagct tcaagccaacaaggccaactggtgtgtctcataagtgacttctaccgggagccg tgacagtggcctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcgggagtgagaccacc acaccctccaacaagcaacaacaagtacgcggccagcagctacctgagcctgac gcctgagcagtggaagtcccacaaaagctacagctgccaggtcaca <u>catgaagggg</u> <u>gcaccgtggagaagacagtgggccccctacagaatgttcatag</u> SEQ ID NO:29
50	26A6-C <sub>L</sub> tipo lambda :	SQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETT TPSKQSNKYAASSYLSTPEQWKSHKSYSCQVT <u>HEGSTVEKTVAPTECS</u> SEQ ID NO: 30

[0055] La persona experta en la técnica apreciará fácilmente que el dominio variable del anticuerpo que tiene el dominio variable descrita anteriormente se puede utilizar para la construcción de otros polipéptidos o anticuerpos de especificidad deseada y función biológica. La persona experta en la técnica apreciará fácilmente que el uso de los dominios variables o CDR descritas en este documento los anticuerpos pueden construirse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en las solicitudes de patente europea EP 0 451 216 A1 y EP 0 549 581 A1. Además, la persona experta en la técnica sabe que la afinidad de unión se puede mejorar haciendo sustituciones de aminoácidos dentro de las CDRs o dentro de los bucles hipervariables (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917), que parcialmente solaparse con las CDR como se define por Kabat.

[0056] El polinucleótido de la invención que codifica el anticuerpo descrito anteriormente puede ser, por ejemplo, ADN, ADNc, ARN o sintéticamente producido ADN o ARN o una molécula de ácido nucleico química producida de forma recombinante que comprende cualquiera de aquellos polinucleótidos solos o en combinación. En una realización, el polinucleótido es un cDNA que codifica la región variable y al menos parte del dominio constante. En una realización preferida se proporciona un vector que comprende el polinucleótido anteriormente, opcionalmente en



combinación con dicho polinucleótido que codifica la región variable de la otra cadena de inmunoglobulina de dicho anticuerpo. Tales vectores pueden comprender otros genes tales como genes marcadores que permiten la selección de dicho vector en una célula huésped adecuada y en condiciones adecuadas.

5 **[0057]** Preferiblemente, el polinucleótido de la invención está unida operativamente a secuencias de control de expresión que permiten la expresión en células procariontas o eucariotas. La expresión de dicho polinucleótido comprende la transcripción del polinucleótido en un mRNA traducible. Los elementos reguladores que aseguran la expresión en células eucariotas, preferiblemente células de mamífero, son bien conocidos para los expertos en la técnica. Normalmente comprenden secuencias reguladoras que aseguran el inicio de la transcripción y  
10 opcionalmente señales de poli-A que aseguran la terminación de la transcripción y la estabilización de la transcripción. Los elementos reguladores adicionales pueden incluir la transcripción así como intensificadores de la traducción, y/o asociado naturalmente o regiones promotoras heterólogas.

**[0058]** A este respecto, la persona experta en la técnica apreciará fácilmente que los polinucleótidos que codifican  
15 al menos el dominio variable de la luz y/o de la cadena pesada puede codificar los dominios variables de ambas cadenas de inmunoglobulina o sólo una cadena.

**[0059]** Del mismo modo, dichos polinucleótidos pueden estar bajo el control del mismo promotor o pueden ser controlados por separado para la expresión. Los posibles elementos reguladores que permiten la expresión en  
20 células huésped procariontas comprenden, por ejemplo, el PL, lac, trp o tac en E. coli, y ejemplos de elementos reguladores que permiten la expresión en células huésped eucariotas son el promotor AOX1 o GAL1 en levadura o el CMV -, SV40, RSV-promotor, potenciador de CMV, SV40 o un intrón de globina en células animales de mamíferos y otros.

25 **[0060]** Además de elementos que son responsables de la iniciación de la transcripción tales elementos reguladores pueden también señales de terminación de la transcripción comprenden, tales como el sitio SV40-poli-A o el sitio tk-poli-A, corriente abajo del polinucleótido. Además, dependiendo del sistema de expresión utilizado secuencias líder capaces de dirigir el polipéptido a un compartimiento celular o secretar en el medio pueden añadirse a la secuencia codificante del polinucleótido de la invención y son bien conocidos en la técnica. La  
30 secuencia líder (s) es (son) ensambla en la fase apropiada con secuencias de traducción, iniciación y terminación, y preferiblemente, una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida, o una porción del mismo, en el espacio periplásmico o el medio extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluye un péptido C o N-terminal de identificación que imparte las características deseadas, por ejemplo, estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado. En este contexto,  
35 vectores de expresión adecuados son conocidos en la técnica tales como Okayama-Berg cDNA vector de expresión pCDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen), o pSPORT1 (GIBCO BRL).

**[0061]** Preferiblemente, las secuencias de control de expresión serán sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células huésped eucariotas, pero secuencias de control para huéspedes  
40 procariontas también pueden usarse. Una vez que el vector se ha incorporado en el huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos, y, según se desee, la recolección y purificación de la inmunoglobulina cadenas ligeras, cadenas pesadas, dímeros de cadena ligera/pesada o anticuerpos intactos, fragmentos de unión u otras formas de inmunoglobulina puede seguir; ver, Beychok, células de inmunoglobulina Síntesis, Academic Press, Nueva York, (1979).

45 **[0062]** Además, la presente invención se refiere a vectores, particularmente plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos utilizados convencionalmente en ingeniería genética que comprenden un polinucleótido que codifica el antígeno o, preferiblemente, un dominio variable de una cadena de inmunoglobulina de un anticuerpo de la invención; opcionalmente en combinación con un polinucleótido de la invención que codifica el dominio variable de la  
50 otra cadena de inmunoglobulina del anticuerpo de la invención. Preferiblemente, dicho vector es un vector de expresión y/o una transferencia de gen o vector de direccionamiento.

**[0063]** Los vectores de expresión derivados de virus tales como retrovirus, virus vaccinia, virus adeno-asociados, virus del herpes, o virus del papiloma bovino, se pueden usar para la entrega de los polinucleótidos o vector de la  
55 invención en la población de células objetivo. Procedimientos que son bien conocidos para los expertos en la técnica se pueden usar para construir vectores virales recombinantes; ver, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) Nueva York y Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Verde Publishing Associates and Wiley Interscience, NY (1994). Alternativamente, los polinucleótidos y vectores de la invención pueden reconstituirse en liposomas para la entrega a células diana. Los  
60 vectores que contienen los polinucleótidos de la invención (por ejemplo, la cadena pesada y/o dominio variable de la luz (s) de las cadenas de inmunoglobulina que codifican secuencias y secuencias de control de expresión) pueden transferirse a la célula huésped mediante procedimientos bien conocidos, que varían dependiendo de el tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procariontas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio o la electroporación se pueden utilizar para la transformación de  
65 otros huéspedes celulares; ver Sambrook, supra.

**[0064]** En relación con lo anterior, la presente invención se refiere además a un célula huésped que comprende dicho polinucleótido o vector. Dicha célula huésped puede ser una célula procariota o eucariota. El polinucleótido o vector de la invención que está presente en la célula hospedadora puede estar integrado en el genoma de la célula huésped o que se pueden mantener extracromosómicamente. La célula huésped puede ser cualquier célula  
 5 procariota o eucariota, tal como una célula bacteriana, de insecto, fúngico, vegetal, animal o célula humana; Las células huésped adecuadas y procedimientos para la producción de los anticuerpos de la presente invención se describen con más detalle en la sección "células huésped" a continuación.

**[0065]** El uso de las células huésped antes mencionadas es posible producir y preparar un anticuerpo de la  
 10 presente invención para, por ejemplo, un uso farmacéutico o como una diana para la intervención terapéutica. Por lo tanto, en una realización, también es un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para preparar un anticuerpo contra IL-32 o fragmento de unión del mismo, comprendiendo dicho procedimiento

(a) cultivar la célula como se ha definido anteriormente; y

(b) aislar dicho anticuerpo contra IL-32 o fragmento de unión del mismo a partir del cultivo.

**[0066]** Por consiguiente, la presente invención se refiere a un anticuerpo contra IL-32 recombinante, preferiblemente humano y fragmento de IL-32 de unión del mismo, cadena de inmunoglobulina (s) del mismo codificado por el polinucleótido de la presente invención o que puede obtenerse por el antes mencionado  
 20 procedimiento para la preparación de un anticuerpo o cadena de inmunoglobulinas anti-IL-32 de los mismos. Medios y procedimientos para la producción recombinante de anticuerpos y miméticos de los mismos, así como procedimientos de cribado para competir moléculas de unión, que pueden o no pueden ser anticuerpos, son conocidos en la técnica. Sin embargo, como se describe en el presente documento, en particular con respecto a las aplicaciones terapéuticas en humano, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo humano en el sentido de que la aplicación de dicho anticuerpo está sustancialmente libre de una respuesta inmunitaria dirigida contra tales  
 25 anticuerpos observada de otro modo para quimérico e incluso anticuerpos humanizados.

**[0067]** Las moléculas de unión, anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden usar directamente como un agente terapéutico. Sin embargo, en una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se proporciona por la presente invención, se etiqueta o unido de forma detectable a un fármaco, preferiblemente en el  
 30 que el marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en una enzima, un radioisótopo, un fluoróforo, un péptido y un metal pesado. Los anticuerpos marcados o fragmentos de unión a antígeno de la presente invención pueden usarse para detectar objetivos específicos in vivo o in vitro, incluyendo "inmunoquímica/inmunomarcaje" como ensayos in vitro. In vivo se pueden usar de una manera similar a las técnicas de formación de imágenes de medicina nuclear para detectar tejidos, células, u otro material que expresan el antígeno de interés. Labels, su uso  
 35 en el diagnóstico y su acoplamiento a las moléculas de unión de la presente invención se describen en más detalle en la sección "etiquetas y diagnósticos" más adelante.

**[0068]** La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden uno cualquiera de los anticuerpos anti-IL-32 o fragmentos de unión a IL-32 de los mismos mencionados anteriormente, el polinucleótido, el  
 40 vector, la célula, el péptido o compuesto basado en péptidos de la presente invención y/o un cóctel de anticuerpos anti-IL-32 o fragmentos de unión a IL-32 de los mismos que en combinación muestran las características de anticuerpo anti-IL-32 o un fragmento de unión a IL-32 del mismo de la presente invención. En una realización, la composición es una composición farmacéutica y comprende adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables, vías de administración y régimen de dosificación pueden  
 45 ser tomados de la literatura correspondiente conocida por la persona experta en la técnica y se describen también en más detalle en las secciones "portadores farmacéuticos" y "régimen de dosificación" más adelante.

**[0069]** Además, la presente solicitud describe un procedimiento para la fabricación de una composición que comprende el anticuerpo monoclonal anti-IL-32 o un fragmento de IL-32 de unión o derivado biotecnológico del  
 50 mismo, que la fabricación comprende la etapa de preparación del anticuerpo, IL-32 fragmento o derivado biotecnológico del mismo mediante expresión de enlace en un organismo huésped recombinante de la transformación de ADN que codifica el anticuerpo, un fragmento de unión a IL-32 o un derivado biotecnológico del mismo. En una realización, la composición es una composición farmacéutica, donde la etapa de preparación del anticuerpo, IL-32 fragmento o derivado biotecnológico del mismo de unión es seguida, opcionalmente después de  
 55 una o más etapas en el medio mediante la mezcla del anticuerpo, fragmento de unión a IL-32 o biotecnológico derivado del mismo con un vehículo farmacéuticamente aceptable en la fabricación de una composición farmacéutica. Por ejemplo, antes de formular en la composición farmacéutica, el anticuerpo o fragmento de unión a IL-32 de los mismos pueden purificarse a partir del cultivo celular para de calidad farmacéutica y/o derivatizar, por ejemplo pegilada o conjugado a un marcador de diagnóstico o de medicamentos con el fin de obtener el  
 60 farmacéutico composición.

**[0070]** Además de ensayos in vitros de base bioquímica y celular, la utilidad terapéutica de los anticuerpos de la presente invención puede validarse en modelos animales apropiados, tal como se describe en detalle en la sección de Ejemplos más adelante.

**[0071]** En una realización, la composición farmacéutica comprende además un agente adicional útil para el

tratamiento de una inflamación o un trastorno autoinmune, preferiblemente en el que dicho agente se selecciona del grupo que consiste en antiinflamatorios no esteroideos (AINE), corticosteroides, anti-histaminas y combinaciones de los mismos. Además o alternativamente, en una realización adicional, la composición farmacéutica comprende además un agente adicional útil para tratar una enfermedad relacionada con la inflamación, seleccionado del grupo 5 que consiste en fármacos inmunosupresores y anti-inflamatorios o "anti-reumáticos".

**[0072]** En otra realización, la composición es una composición o kit de diagnóstico y además comprende los reactivos utilizados convencionalmente en procedimientos de diagnóstico de base inmunitaria o basados en ácidos nucleicos.

10

**[0073]** Además, la presente invención proporciona el anticuerpo anti-IL-32 o fragmento de unión a IL-32 del mismo mencionados anteriormente, o la composición tal como se define anteriormente en esta memoria para usa en un procedimiento de:

- (a) tratar o prevenir la progresión de una enfermedad o afección mediada por el sistema inmunitario o autoinmune;  
 15 (b) mejora de los síntomas asociados con enfermedad o afección mediada por el sistema inmunitario o autoinmune; y/o  
 (c) el diagnóstico o cribado de un sujeto por la presencia o para determinar el riesgo de un sujeto de desarrollar una enfermedad o afección mediada por el sistema inmunitario o autoinmune;  
 en el que el trastorno se asocia con la expresión elevada de IL-32 y/o actividad perjudicial de IL-32 en un paciente.

20

**[0074]** A este respecto, pueden usarse varias vías de aplicación. En una realización de la presente invención, se proporciona el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno mencionados anteriormente, y/o un cóctel de anticuerpos que en combinación muestran las características de un anticuerpo de la presente invención, que está diseñado para ser administrado por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, parenteral o como un 25 aerosol.

**[0075]** Como se indicó anteriormente, debido a su especificidad de unión, las moléculas de la presente invención, tales como anticuerpos y fragmentos de los mismos, se puede utilizar preferentemente en el procedimiento de tratamiento definido anteriormente, mejora, diagnóstico y/o cribado de un trastorno o afección mediada por el 30 sistema inmunitario o autoinmune asociado con y/o causado por la expresión de IL-32, elevada y/o actividad perjudicial de la IL-32. Por ejemplo, la expresión, elevada y/o activada de IL-32 perjudicial se ha observado en biopsias de tejido sinovial con artritis reumatoide (RA), en el que el nivel de expresión de IL-32 se correlaciona positivamente con la severidad de la inflamación (Alsaleh et al., (2010), supra; Cagnard et al, (2005), supra). Además de la artritis reumatoide (RA), se encontró que IL-32 estaba funcionalmente asociada con varios otros trastornos, por 35 ejemplo, la espondilitis anquilosante (Ciccia et al., (2012), supra), la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), la miastenia gravis (MG), la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, enfermedad de Crohn, psoriasis, inflamación vascular y aterosclerosis (Kobayashi et al, (2010)), dermatitis atópica y cáncer (Alsaleh et al, (2010); Breenan y Beech, (2007) ; Asquith y McInnes (2007); Dinarello y Kim, (2006); Fantini et al, (2007, todos supra). IL-32 también puede jugar un papel en la respuesta inmunitaria a la tuberculosis (Kundu y Basu, (2006); Netea et al, 40 (2006); supra). También, se ha observado un aumento de la transcripción de IL-32 después de la infección por bacterias y virus, tales como *Mycobacterium tuberculosis*, supra) o gripe A ((Netea et al, (2006). Li et al., (2008), supra) indicando su posible papel en la defensa del huésped.

**[0076]** Por lo tanto, en una realización se proporciona el anticuerpo anti-IL-32 o fragmento de unión a IL-32 del 45 mismo o la composición tal como se define anteriormente en este documento para usar en el procedimiento mencionado anteriormente, en el que dicha enfermedad es una enfermedad autoinmune, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en artritis reumatoide (RA), espondilitis anquilosante y otras formas de espondiloartritis incluyendo, pero no limitado a, artritis psoriásica, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), incluyendo la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enfermedad celíaca), psoriasis, miastenia grave (MG), 50 enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, tuberculosis, la inflamación vascular y la aterosclerosis, dermatitis atópica, la tuberculosis y el cáncer incluyendo leucemia.

**[0077]** Debido a la multitud de moléculas adecuadas en el tratamiento de, por ejemplo, trastornos asociados con la inflamación presentó en este documento, la presente invención también se refiere a procedimientos de tratamiento, 55 el diagnóstico y/o pronosticar el curso probable y el resultado de tales trastornos, preferiblemente en el que el inmune mediada o enfermedad autoinmune o condición está asociada con la expresión, elevado y/o actividad perjudicial de la IL-32 y al uso de las moléculas de la presente invención. En una realización se proporciona un procedimiento para el tratamiento del trastorno tal, procedimiento que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo antes mencionado o fragmento de unión 60 al antígeno, el cóctel de anticuerpos que en la visualización de combinación las características de una anticuerpo de la presente invención.

**[0078]** Los procedimientos de tratamiento basados en el uso de sólo un anticuerpo monoclonal específico para un epítipo de un antígeno particular, que está relacionada o causar una enfermedad puede sufrir de varios 65 defectos. Por ejemplo, dificultades y probablemente ineficiencia de tratamiento pueden provenir de la multiplicidad de los mecanismos patogénicos que causan un trastorno específico que requiere la orientación de varios antígenos

de forma simultánea. Además, la diversidad inherente de la población de pacientes tiene que ser tomada en cuenta en relación con, por ejemplo, el polimorfismo, la heterogeneidad de glicosilación o ligera desnaturalización de un antígeno dado, ya sea en diferente o en un paciente que puede conducir a una disminución de la eficiencia de la monoclonal de unión anticuerpo utilizado por lo menos. Algunas de estas deficiencias pueden ser eludidas mediante, por ejemplo, proyecciones de pretratamiento para determinar si el antígeno es inmunológicamente relevantes para los pacientes destinados a ser tratado y de si hay algún cambio epítipo en los pacientes particulares. Sin embargo, tales proyecciones a menudo se omiten ya sea debido a la urgencia del tratamiento o restricciones de costos. Por lo tanto, la presente invención se refiere además a procedimientos basados en la aplicación de más de un tipo de una molécula de unión a la vez a un paciente, es decir, a la aplicación de un cóctel de moléculas de unión. Estas moléculas de unión pueden unirse específicamente a una IL-32 de isotipo a diferentes epítopos, cada una de las moléculas de unión aplicada puede unirse específicamente otra IL-32 isotipo o varias moléculas de unión se utilizan vinculantes a varios epítopos de más de una IL-32 de isotipo. En el caso de las moléculas de unión de la presente invención se dirigen (se unen específicamente) hacia una IL-32 de isotipo como antígeno, su especificidad de unión se dirige a epítopos distintos de dicho antígeno. El uso de tales cócteles es en particular previsto para el tratamiento de pacientes que sufren de trastornos autoinmunes tales como APS1, que en vista de la presencia de autoanticuerpos contra unos 3.000 antígenos endógenos a menudo no son susceptibles a la monoterapia con un anticuerpo particular. En tales casos, se espera que la terapia de combinación con dos o más anticuerpos monoclonales de la presente invención con la misma o diferente especificidad de antígeno para lograr al menos algún alivio de los síntomas.

**[0079]** La presente invención extensiones naturalmente también a los procedimientos de diagnóstico y pronóstico dirigidas hacia el diagnóstico inmune mediada o condiciones autoinmunes y trastornos asociados con la expresión, elevada y/o actividad perjudicial de uno o más isotipos de IL-32, preferiblemente de IL-32 $\gamma$  y/o pronóstico del desarrollo de la enfermedad, es decir, su progresión, la respuesta al tratamiento o la recuperación. Por lo tanto, en una realización la presente invención se refiere a un procedimiento de diagnóstico de una inmune mediada o enfermedad autoinmune o afección en un sujeto asociado con la expresión, elevada y/o la actividad perjudicial de la IL-32 comprende poner en contacto una muestra biológica del sujeto con una anti-IL-32 o anticuerpo IL-32 fragmento de unión del mismo de la presente invención, y detectar la presencia de IL-32. En una realización preferida, el detectó IL-32 isotipo es IL-32 $\gamma$ . Además, en una realización la presente invención se refiere a un procedimiento de detectar o determinar IL-32 en una muestra biológica aislada que comprende mezclar la muestra con un anticuerpo anti-IL-32 de la presente invención, permitiendo que el anticuerpo para formar un complejo con cualquier IL-32 isotipo presente en la mezcla, y detectar el complejo presente en la mezcla, preferiblemente en la que IL-32 es IL-32 $\gamma$ .

**[0080]** Como ya se mencionó anteriormente, en una realización, la presente invención se refiere a un kit para el diagnóstico de una inmune mediada o enfermedad autoinmune o afección asociada con la expresión de IL-32, que comprende el anticuerpo antes mencionado o fragmento de unión a antígeno de dicho kit, el polinucleótido, el vector o la célula, opcionalmente con reactivos y/o instrucciones de uso. Asociado con los kits de la presente invención, por ejemplo, dentro de un recipiente que comprende el kit puede ser un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, nota que refleja la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para la administración humana. Además o alternativamente el kit comprende reactivos y/o instrucciones para su uso en ensayos de diagnóstico apropiados. Las composiciones, es decir, kits de la presente invención son, por supuesto, particularmente adecuada para el diagnóstico, prevención y tratamiento de un trastorno o afección que se acompaña con la expresión de IL-32, aplicable en particular para el tratamiento de enfermedades como se mencionó anteriormente. En una realización particularmente preferida, el trastorno se asocia con la expresión de una o más de IL-32 isotipos.

**[0081]** En otra realización, la presente invención se refiere a una composición de diagnóstico que comprende uno cualquiera de los anteriores describe moléculas, anticuerpos, fragmentos de unión a antígenos, péptidos o compuestos basados en péptidos, polinucleótidos, vectores o células de la invención y medios opcionalmente adecuados de unión para la detección tales como reactivos usados convencionalmente en los procedimientos de diagnóstico basados en ácido inmuno o nucleico. Los anticuerpos de la invención son, por ejemplo, adecuado para su uso en inmunoensayos en los que se pueden utilizar en fase líquida o unidos a un soporte en fase sólida. Ejemplos de inmunoensayos que pueden utilizar el anticuerpo de la invención son inmunoensayos competitivos y no competitivos en un formato directo o indirecto. Ejemplos de tales inmunoensayos son el radioinmunoensayo (RIA), el sándwich (ensayo inmunométrico), citometría de flujo y el ensayo de transferencia Western. Los antígenos y anticuerpos de la invención pueden unirse a muchos vehículos diferentes y usarse para aislar células específicamente unidas a la misma. Los ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nylon, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas, y magnetita. La naturaleza del portador puede ser soluble o insoluble para los propósitos de la invención. Existen muchos marcadores y procedimientos de marcaje conocidos por los expertos normales en la técnica diferentes. Ejemplos de los tipos de marcadores que se pueden utilizar en la presente invención incluyen enzimas, radioisótopos, metales coloidales, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes, y compuestos bioluminiscentes; véase también las realizaciones discutidas anteriormente.

Definiciones y realizaciones

**[0082]** A menos que se indique lo contrario, un término y una realización, tal como se usan en el presente documento, se proporciona la definición tal como se proporciona y se utiliza en las solicitudes internacionales WO 2013/098419 A1 y WO 2013/098420 A1. Para complementario, un término común, tal como se usa en el presente documento, se proporciona la definición de lo dispuesto en el Diccionario Oxford de Bioquímica y Biología Molecular, Oxford University Press, 1997, revisado en 2000 y reimpresso 2003, ISBN 0 19 850673 2.

**[0083]** Cabe indicar que el término "un" o "una" entidad se refiere a uno o más de esa entidad; por ejemplo, "un anticuerpo" se entiende que representará uno o más anticuerpos. Como tales, los términos "un" (o "una"), "uno o más" y "al menos uno" pueden utilizarse indistintamente en este documento.

**[0084]** El término "neutralizar" y "anticuerpo neutralizante", respectivamente, se utiliza como es habitual en la técnica en que un anticuerpo se entiende que reduce o suprime al menos alguna actividad biológica de un antígeno o de un microorganismo vivo. Por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-32 específico de isotipo de la presente invención es un anticuerpo neutralizante, si, en cantidades adecuadas, suprime o reduce la actividad de los respectivos isotipos de IL-32, por ejemplo, en un ensayo tal como se describe en los Ejemplos. La neutralización se define comúnmente mediante concentraciones inhibitorias del 50% (IC 50) y se puede evaluar estadísticamente basada en el área bajo las curvas de titulación por neutralización (AUC). Los valores de IC50 de anticuerpos anti-IL-32 de ejemplo de la presente invención se describen y se muestran en el presente documento, por ejemplo, un anticuerpo 2C2 de ejemplo tiene un valor de IC50 de IL-32γ de 300 ng/ml.

#### Péptidos y polipéptidos:

**[0085]** El término "péptido" se entiende que incluye los términos "polipéptido" y "proteína" (que, a veces, pueden utilizarse indistintamente en este documento) y cualquier secuencia de aminoácidos, tal como las de la región variable de cadena pesada y cadena ligera, así como la región constante de la presente invención dentro de su significado. Del mismo modo, los fragmentos de proteínas y polipéptidos también se contemplan y pueden ser referidos en el presente documento como "péptidos". Sin embargo, el término "péptido" significa preferentemente un polímero de aminoácidos que incluye al menos 5 aminoácidos contiguos, preferiblemente al menos 10 aminoácidos contiguos, más preferiblemente al menos 15 aminoácidos contiguos, aún más preferiblemente al menos 20 aminoácidos contiguos, y particularmente preferente al menos 25 aminoácidos contiguos. Además, el péptido de acuerdo con la presente invención típicamente no tiene más de 100 aminoácidos contiguos, preferiblemente menos de 80 aminoácidos contiguos y más preferiblemente menos de 50 aminoácidos contiguos.

**[0086]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "polipéptido" se pretende abarcar un "polipéptido" singular, así como "polipéptidos" plurales, tales como anticuerpos de la presente invención, y se refiere a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) linealmente unidos por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, y no se refiere a una longitud específica del producto. Por lo tanto, "péptidos", "dipéptidos", "tripéptidos", "oligopéptidos", "proteína", "cadena de aminoácidos", o cualquier otro término utilizado para referirse a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, se incluyen dentro de la definición de "polipéptido", y el término "polipéptido" se puede usar en lugar de, o de forma intercambiable con, cualquiera de estos términos.

**[0087]** El término "polipéptido" también pretende hacer referencia a los productos de las modificaciones post-expresión del polipéptido, incluyendo, sin limitación, glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica o modificación por aminoácidos no naturales. Un polipéptido puede derivar de una fuente biológica natural o puede producirse por tecnología recombinante, pero no se traduce necesariamente de una secuencia de ácido nucleico designada. Se puede generar de cualquier manera, incluyendo mediante síntesis química.

**[0088]** Un polipéptido de la invención puede ser de un tamaño de aproximadamente 3 o más, 5 o más, 10 o más, 20 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más, 1000 o más, o 2000 o más aminoácidos. Sin embargo, el término "polipéptido" significa preferentemente un polímero de aminoácidos que incluye al menos 100 aminoácidos. Los polipéptidos pueden tener una estructura tridimensional definida, aunque no necesariamente tienen tal estructura. Los polipéptidos con una estructura tridimensional definida se conocen como plegados, y los polipéptidos que no poseen una estructura tridimensional definida, sino que puede adoptar un gran número de conformaciones diferentes, se denominan como no plegados. Tal como se utiliza en el presente documento, el término glicoproteína se refiere a una proteína acoplada a al menos un resto de carbohidrato que se une a la proteína a través de la cadena lateral que contiene oxígeno o contiene nitrógeno de un residuo de aminoácido, por ejemplo, un residuo de serina o un residuo de asparagina.

**[0089]** Por un polipéptido "aislado" o un fragmento, variante o derivado del mismo se entiende un polipéptido que no está en su medio natural. No se requiere un nivel particular de purificación. Por ejemplo, un polipéptido aislado que puede ser extraído de su entorno nativo o natural. Los polipéptidos y proteínas producidos de forma recombinante expresados en células huésped se consideran aislados para los objetivos de la invención, ya que son polipéptidos nativos o recombinantes que han sido separados, fraccionados o parcialmente o sustancialmente

purificados mediante cualquier técnica adecuada.

- [0090]** "Péptidos, polipéptidos o proteínas recombinantes" se refieren a péptidos, polipéptidos o proteínas producidos por técnicas de ADN recombinante, es decir, producidos a partir de células, microbianas o de mamífero, transformadas por un constructo de expresión de ADN recombinante exógeno que codifica la proteína de fusión que incluye el péptido deseado. Las proteínas o péptidos expresados en la mayoría de los cultivos bacterianos típicamente estarán libres de glicano. Las proteínas o polipéptidos expresados en levadura pueden tener un patrón de glicosilación diferente del expresado en células de mamífero.
- [0091]** También se incluyen como polipéptidos de la presente invención fragmentos, derivados, análogos y variantes de los polipéptidos anteriores y cualquier combinación de los mismos. Los términos "fragmento", "variante", "derivado" y "análogo" incluyen péptidos y polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos suficientemente similar a la secuencia de aminoácidos del péptido natural. El término "suficientemente similar" significa una primera secuencia de aminoácidos que contiene un número suficiente o mínimo de residuos de aminoácidos idénticos o equivalentes con relación a una segunda secuencia de aminoácidos de tal manera que la primera y segunda secuencias de aminoácidos tienen un dominio estructural común y/o actividad funcional común. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos que comprenden un dominio estructural común que es al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o al menos aproximadamente 100%, idénticas se definen en el presente documento como suficientemente similares. Preferiblemente, las variantes serán suficientemente similares a la secuencia de aminoácidos de los péptidos preferidos de la presente invención, en particular, a anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, o a péptido sintético o compuesto basado en péptido que comprende epítomos reconocidos por los anticuerpos de la presente invención o fragmentos, variantes, derivados o análogos de cualquiera de ellos. Dichas variantes generalmente retienen la actividad funcional de los péptidos de la presente invención, es decir, están unidos por los anticuerpos de la presente invención. Las variantes incluyen péptidos que difieren en la secuencia de aminoácidos del péptido nativo y wt, respectivamente, a modo de una o más eliminaciones, adiciones y/o sustituciones de aminoácidos. Estas pueden ser variantes naturales, así como diseñadas artificialmente.

- [0092]** Los términos "fragmento", "variantes", "derivado" y "análogo" cuando se refiere a anticuerpos o polipéptidos de anticuerpo de la presente invención incluyen cualesquiera polipéptidos que retienen al menos algunas de las propiedades de unión a antígeno de la correspondiente nativa de unión molécula, anticuerpo, o polipéptido. Los fragmentos de polipéptidos de la presente invención incluyen fragmentos proteolíticos, así como fragmentos de delección, además de fragmentos de anticuerpos específicos discutidos en este documento. Las variantes de anticuerpos y polipéptidos de anticuerpo de la presente invención incluyen fragmentos que se han descrito anteriormente, y también polipéptidos con alteraciones de secuencias de aminoácidos debido al aminoácido sustituciones, deleciones, o inserciones. Las variantes pueden ocurrir naturalmente o ser de origen no natural. Variantes de origen no natural pueden producirse usando técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica. Polipéptidos variantes pueden comprender conservadoras o no conservadoras de aminoácidos sustituciones, deleciones o adiciones. Los derivados de las moléculas de la presente invención unión, por ejemplo, los anticuerpos y polipéptidos de anticuerpo de la presente invención, son polipéptidos que se han alterado de manera que presente características adicionales que no se encuentran en el polipéptido nativo. Los ejemplos incluyen proteínas de fusión. Polipéptidos variantes también pueden ser referidos en la presente como "análogos de polipéptidos". Tal como se usa en el presente documento un "derivado" de una molécula de unión o fragmento de la misma, un anticuerpo, o un polipéptido de anticuerpo se refiere a un polipéptido sujeto que tiene uno o más residuos químicamente derivatizados mediante reacción de un grupo lateral funcional. También se incluyen como "derivados" son péptidos que contienen uno o más aminoácidos de origen natural derivados de ácido de los veinte aminoácidos estándar. Por ejemplo, 4-hidroxiprolina se puede sustituir por prolina; 5-hidroxilisina se puede sustituir por lisina; 3-metilhistidina se puede sustituir por histidina; homoserina puede ser sustituida por serina; y ornitina se puede sustituir por lisina.

**55** Determinación de similitud y/o identidad de las moléculas:

- [0093]** La "similitud" entre dos péptidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos de un péptido con la secuencia de un segundo péptido. Un aminoácido de un péptido es similar al correspondiente aminoácido de un segundo péptido si es idéntico o una sustitución conservadora de aminoácidos. Las sustituciones conservadoras incluyen las descritas en Dayhoff, MO, ed., The Atlas of Protein Sequence and Structure 5, National Biomedical Research Foundation, Washington, DC (1978), y en Argos, EMBO J. 8 (1989), 779-785. Por ejemplo, los aminoácidos pertenecientes a uno de los siguientes grupos representan cambios o sustituciones conservativas: Ala, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Thr; Cys, Ser, Tyr, Thr; Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe; Lys, Arg, His; Phe, Tyr, Trp, His; y Asp, Glu.

**[0094]** La determinación del porcentaje de identidad o similitud entre dos secuencias se realiza preferiblemente usando el algoritmo matemático de Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA. 90: 5873-5877. Dicho algoritmo se incorpora en los programas BLASTn y BLASTp de Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 disponible en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

5

**[0095]** La determinación del porcentaje de identidad o similitud se realiza con los parámetros estándar de los programas BLASTn y BLASTp.

**[0096]** Las búsquedas BLAST de polinucleótidos se realizan con el programa BLASTN.

10

**[0097]** Para los parámetros generales, el bloque "Max Target Sequences" se puede fijar en 100, el bloque "Short queries" puede estar marcada, el bloque "Expect threshold" se puede fijar en 10 y el bloque "Word Size" se puede fijar a 28. Para los parámetros de puntuación el "Match/mismatch Scores" se puede fijar en 1, -2 y el bloque "Gap Costs" se puede fijar a lineal. Para los parámetros Filters and Masking, el bloque "Low complexity regions" no puede estar marcado, el bloque "Species-specific repeats" no puede estar marcado, el bloque "Mask for lookup table only" puede estar marcado y el bloque "Mask lower case letters" puede no estar marcado.

15

**[0098]** Las búsquedas de proteína BLAST se realizan con el programa BLASTP. Para los parámetros generales, el cuadro de "Max secuencias diana" se puede establecer en 100, el cuadro de "las preguntas cortas" puede ser marcada, la caja "Hay que esperar umbral" se puede establecer en 10 y la caja de "tamaño de la palabra" puede ajustarse en "3". Para los parámetros de puntuación de la caja "Matrix" puede ser ajustado a "BLOSUM62", la "brecha de costos" caja puede fijarse en "Existencia: 11 Extensión: 1", el cuadro de "ajustes en la composición" se puede establecer en "puntuación de composición condicional ajuste de la matriz". Para los filtros y parámetros de enmascaramiento de la caja "regiones de baja complejidad" no puede ser marcada, la "máscara de tabla de consulta única" caja no puede ser marcada y la casilla de "Máscara letras minúsculas" no puede ser marcada.

20

25

polinucleótidos:

**[0099]** El término "polinucleótido" pretende comprender un ácido nucleico singular, así como ácidos nucleicos plurales, y se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico aislada, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm) o ADN de plásmido (pADN). Un polinucleótido puede comprender una unión de fosfodiéster convencional o una unión no convencional (por ejemplo, una unión de amida, tal como la que se encuentra en los ácidos nucleicos de péptido (PNA)). El término "ácido nucleico" se refiere a cualquiera de uno o más segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido. Por ácido nucleico o polinucleótido "aislado" se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN que ha sido eliminada de su ambiente nativo. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un anticuerpo contenido en un vector se considera aislado para los propósitos de la presente invención. Los ejemplos adicionales de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células huésped heterólogas o polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en solución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcripciones de ARN *in vivo* o *in vitro* de polinucleótidos de la presente invención. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados según la presente invención, incluyen además dichas moléculas producidas en forma sintética. Además, el polinucleótido o ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento regulador, tal como un promotor, sitio de unión a ribosoma o un terminador de transcripción.

30

35

40

**[0100]** Tal como se utiliza en la presente invención, una "región de codificación" es una parte de un ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Aunque un "codón de detención" (TAG, TGA o TAA) no se traduce en un aminoácido, puede considerarse como parte de una región de codificación, aunque cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo, promotores, sitios de unión de ribosoma, terminadores de transcripción, intrones y similares no son parte de la región de codificación. Dos o más regiones de codificación de la presente invención pueden estar presentes en una sola construcción de polinucleótido, por ejemplo, en un solo vector, o en construcciones de polinucleótido separadas, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una sola región de codificación, o puede comprender dos o más regiones de codificación, por ejemplo, un solo vector puede codificar por separado una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina. Además, un vector, polinucleótido, o un ácido nucleico de la presente invención puede codificar regiones de codificación heterólogas, ya sea fusionadas o no fusionadas a un ácido nucleico que codifica una molécula de unión, un anticuerpo, un fragmento, variante o derivado del mismo. Las regiones de codificación heteróloga incluyen sin limitación elementos o motivos especializados, tales como un péptido de señal de secreción o un dominio funcional heterólogo.

45

50

55

**[0101]** En ciertas realizaciones, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En el caso de ADN, un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido normalmente puede incluir un promotor y/o otros elementos de control de transcripción o traducción que pueden operar asociados con una o más regiones de codificación. Una asociación operable es cuando una región de codificación de un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, está asociada con una o más secuencias reguladoras en tal forma que se pone la expresión del producto génico bajo la influencia o control de la(s) secuencia(s) reguladora(s). Dos fragmentos de ADN (tal como una región de codificación de polipéptido y un promotor asociado con la misma) están "asociados en forma operativa" o "enlazados en forma operativa" si la inducción de la función del promotor da como resultado la transcripción del ARNm que codifica el producto génico deseado y si la naturaleza de la unión entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la

60

65

capacidad de las secuencias reguladoras de expresión de dirigir la expresión del producto génico o interferir con la capacidad que tiene la plantilla de ADN de ser transcrita. Por lo tanto, una región promotora se asociaría de manera operativa con un ácido nucleico que codifica un polipéptido, si el promotor tenía la capacidad de efectuar la transcripción de dicho ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de célula que dirige la transcripción sustancial del ADN únicamente en células predeterminadas. Otros elementos de control de transcripción, además de un promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores y señales de terminación de transcripción, pueden ser operativos en forma asociada con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de la célula. Los promotores adecuados y otras regiones de control de transcripción se describen en el presente documento.

10

**[0102]** Una variedad de regiones de control de la transcripción son conocidos para los expertos en la técnica. Estos incluyen, sin limitación, regiones de control de la transcripción que funcionan en células de vertebrados, tales como, pero no limitados a, segmentos promotores y potenciadores de citomegalovirus (promotor temprano inmediato, en conjunto con el intrón-A), virus de simio 40 (el promotor temprano) y retrovirus (tales como virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control de la transcripción incluyen las derivadas de genes de vertebrados, tales como actina, proteína de choque térmico, la hormona de crecimiento bovina y de  $\beta$ -globina de conejo, así como otras secuencias capaces de controlar la expresión génica en células eucariotas. Las regiones de control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores y potenciadores específicos de tejido, así como promotores inducibles por linfocinas (por ejemplo, promotores inducibles por interferones o interleucinas).

20

**[0103]** Del mismo modo, una variedad de elementos de control de traducción son conocidos por los expertos en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a, los sitios de unión a ribosomas, codones de iniciación y terminación de la traducción, y elementos derivados de picornavirus (en particular un sitio de entrada del ribosoma interno, o IRES, también conocidos como una secuencia CITE).

25

**[0104]** En otras realizaciones, un polinucleótido de la presente invención es ARN, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (ARNm), ARN de horquilla pequeño (shRNA), ARN de interferencia pequeño (siRNA) o cualquier otro producto de ARN.

**[0105]** Las regiones codificantes de polinucleótido y ácido nucleico de la presente invención pueden estar asociadas con las regiones de codificación adicionales que codifican péptidos secretores o de señales, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente invención. De acuerdo con la hipótesis de la señal, las proteínas secretadas por células de mamífero tienen un péptido señal o secuencia líder secretora que se escinde de la proteína madura una vez que se ha iniciado la exportación de la cadena de proteína creciente a través del retículo endoplasmático rugoso. Los expertos en la técnica son conscientes de que los polipéptidos segregados por las células de vertebrados en general tienen un péptido señal fusionado con el N-terminal del polipéptido, que se escinde del polipéptido completo o "de longitud completa" para producir una forma secretada o "madura" del polipéptido. En ciertas realizaciones, se utiliza el péptido señal nativo, por ejemplo, un péptido señal de cadena pesada o cadena ligera de inmunoglobulina, o un derivado funcional de esa secuencia que conserva la capacidad para dirigir la secreción del polipéptido que está operativamente asociado con el mismo. Alternativamente, se puede usar un péptido señal de mamífero heterólogo, o un derivado funcional del mismo. Por ejemplo, la secuencia líder de tipo salvaje puede estar sustituida por la secuencia líder del activador de plasminógeno de tejido humano (TPA) o la  $\beta$ -glucuronidasa de ratón. Sin embargo, la producción intracelular de los polipéptidos, en particular de las inmunoglobulinas y fragmentos de las mismas, de la presente invención también es posible.

#### Expresión:

**[0106]** El término "expresión", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso por el cual un gen produce un producto bioquímico, por ejemplo, un ARN o polipéptido. El proceso incluye cualquier manifestación de la presencia funcional del gen dentro de la célula incluyendo, sin limitación, knockdown de genes, así como la expresión transitoria y la expresión estable. Incluye, sin limitación, transcripción del gen en ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), ARN de horquilla pequeño (shRNA), ARN de interferencia pequeño (siRNA) o cualquier otro producto de ARN, y la traducción de dicho ARNm en polipéptido o polipéptidos. Si el producto final deseado es un producto bioquímico, la expresión incluye la creación de ese producto bioquímico y cualquier precursor. La expresión de un gen produce un "producto génico". Tal como se usa en este documento, un producto génico puede ser un ácido nucleico, por ejemplo, ARN de interferencia pequeño (siRNA), un ARN mensajero producido por la transcripción de un gen, o un polipéptido que se traduce a partir de una transcripción. Los productos génicos descritos en este documento incluyen además ácidos nucleicos con modificaciones post-transcripcionales, por ejemplo, de poliadenilación, o polipéptidos con modificaciones post-traduccionales, por ejemplo, metilación, glicosilación, adición de los lípidos, la asociación con otras subunidades de proteínas, escisión proteolítica, y similares.

**[0107]** Una variedad de sistemas de vector de expresión/huésped puede utilizarse para contener y expresar secuencias de polinucleótidos. Estas incluyen, pero no se limitan a, microorganismos, tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófagos recombinantes, plásmido o cósmidos; levadura



transformada con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células vegetales transformadas con vectores de expresión de virus (por ejemplo, virus del mosaico de coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, plásmidos Ti o pBR322); o sistemas de células animales.

5

**[0108]** Para expresar el péptido, polipéptido o proteína de fusión (en lo sucesivo, "producto") en una célula huésped, se puede utilizar un procedimiento tal como el siguiente. Un fragmento de restricción que contiene una secuencia de ADN que codifica dicho producto puede clonarse en un plásmido recombinante apropiado que contiene un origen de replicación que funciona en la célula huésped y un marcador seleccionable apropiado. El plásmido puede incluir un promotor para la expresión inducible del producto (por ejemplo, pTrc (Amann et al, Gene 69 (1988), 301-315) y pETL Id (Studier et al, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990), 60-89). El plásmido recombinante se puede introducir en la célula huésped mediante, por ejemplo, electroporación y las células que contienen el plásmido recombinante se pueden identificar mediante selección para el marcador en el plásmido. La expresión del producto puede ser inducida y detectada en la célula huésped utilizando un ensayo específico para el producto.

10

15

**[0109]** En algunas realizaciones, el ADN que codifica el producto/péptido se puede optimizar para la expresión en la célula huésped. Por ejemplo, el ADN puede incluir codones para uno o más aminoácidos que son predominantes en la célula huésped en relación a otros codones para el mismo aminoácido.

20

**[0110]** Alternativamente, la expresión del producto puede realizarse por síntesis in vitro de la proteína en extractos libres de células, que también son particularmente adecuados para la incorporación de aminoácidos modificados o no naturales para estudios funcionales; véase también *infra*. El uso de sistemas de traducción in vitro puede tener ventajas sobre la expresión génica in vivo cuando el producto sobreexpresado es tóxico para la célula huésped, cuando el producto es insoluble o forma cuerpos de inclusión, o cuando la proteína experimenta una rápida degradación proteolítica por proteasas intracelulares. Los sistemas de traducción libres de células más utilizados consisten en extractos de reticulocitos de conejo, germen de trigo y *Escherichia coli*. Todos se preparan como extractos crudos que contienen todos los componentes macromoleculares (ribosomas 70S o 80S, ARNt, aminoacil-ARNt sintetasas, factores de iniciación, elongación y terminación, etc.) necesarios para la traducción del ARN exógeno. Para asegurar la traducción eficiente, cada extracto debe ser complementado con aminoácidos, fuentes de energía (ATP, GTP), sistemas de regeneración de energía (fosfato de creatina y creatina fosfoquinasa para sistemas eucariotas, y fosfoenol piruvato y piruvato quinasa para el lisado de *E. coli*), y otros co-factores conocidos en la técnica (Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, etc.). Sistemas apropiados de transcripción/traducción están disponibles comercialmente, por ejemplo de Promega Corporation, Roche Diagnostics, y Ambion, es decir, Applied Biosystems (Anderson, C. et al, Meth Enzymol 101 (1983), 635-644; Arduengo, M. et al (2007), The Role of Cell Free Rabbit Reticulocyte Expression systems in functional Proteomics in, eds Kudlicki, Katzen y Bennett, Cell-free Expression Vol. 2007. Austin, Tx: Landes Bioscience, pp 1-18; Chen y Zubay, Meth Enzymol 101 (1983), 674-90; Ezure et al, Biotechnol Prog 22 (2006), 1570-1577).

25

30

35

#### 40 Células huésped:

**[0111]** Con respecto a la presente invención, la célula huésped puede ser cualquier célula procarionta o eucariota, tal como una célula bacteriana, de insecto, fúngica, vegetal, animal o célula humana. Las células fúngicas preferidas son, por ejemplo, las del género *Saccharomyces*, en particular las de la especie *S. cerevisiae*. El término "procarionta" se entiende que incluye todas las bacterias que pueden ser transformadas o transfectadas con moléculas de ADN o ARN para la expresión de un anticuerpo de la invención o las correspondientes cadenas de inmunoglobulina. Los huéspedes procariontas pueden incluir bacterias gram negativo, así como bacterias gram positivas, tales como, por ejemplo, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*. El término "eucariota" se entiende que incluye levadura, plantas superiores, insectos y preferiblemente células de mamífero, lo más preferiblemente células HEK 293, NSO, OSC y CHO. Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los anticuerpos o cadenas de inmunoglobulina codificados por el polinucleótido de la presente invención pueden estar glicosilados o pueden estar no glicosilados. Los anticuerpos de la invención o las correspondientes cadenas de inmunoglobulina pueden incluir también un residuo de aminoácido metionina inicial. Un polinucleótido de la invención se puede usar para transformar o transfectar el huésped utilizando cualquiera de las técnicas comúnmente conocidas por los expertos en la técnica. Además, los procedimientos para la preparación de genes unidos operativamente fusionados y expresión en, por ejemplo, células de mamíferos y bacterias son bien conocidos en la técnica (Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Las construcciones y procedimientos genéticos descritos en la misma se pueden utilizar para la expresión del anticuerpo de la invención o las correspondientes cadenas de inmunoglobulina en huéspedes eucariotas o procariontas. En general, los vectores de expresión que contienen secuencias promotoras que facilitan la transcripción eficiente del polinucleótido insertado se utilizan en conexión con el huésped. El vector de expresión contiene típicamente un origen de replicación, un promotor, y un terminador, así como genes específicos que son capaces de proporcionar una selección fenotípica de las células transformadas. Las células fuente adecuadas para las secuencias de ADN y células huésped para la expresión y secreción de inmunoglobulinas pueden obtenerse de un número de fuentes, tales como la American Type Culture Collection ("Catálogo de Líneas celulares y hibridomas", quinta edición (1985) Rockville, Maryland, Estados Unidos). Además, los animales

55

60

65

transgénicos, preferiblemente mamíferos, que comprenden células de la invención pueden usarse para la producción a gran escala del anticuerpo de la invención.

**[0112]** Los huéspedes transformados pueden crecer en fermentadores y cultivarse de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica para conseguir un crecimiento celular óptimo. Una vez expresados, los anticuerpos enteros, sus dímeros, cadenas ligeras y pesadas individuales, u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención, se pueden purificar de acuerdo con procedimientos estándar de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares; ver, Scopes, "Protein purification", Springer Verlag, Nueva York (1982). El anticuerpo o su cadena o cadenas de inmunoglobulina correspondientes de la invención se pueden aislar del medio de crecimiento, lisados celulares, o fracciones de membrana celulares. El aislamiento y la purificación de los, por ejemplo, anticuerpos expresados de forma recombinante o cadenas de inmunoglobulina de la invención pueden ser por cualquier medio convencional tal como, por ejemplo, separaciones cromatográficas preparativas y separaciones inmunológicas, tales como las que implican el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos, por ejemplo, contra la región constante del anticuerpo de la invención. Será evidente para los expertos en la técnica que los anticuerpos de la invención pueden acoplarse adicionalmente a otros restos para, por ejemplo, direccionamiento de fármacos y aplicaciones de formación de imágenes. Dicho acoplamiento puede realizarse químicamente después de la expresión del anticuerpo o antígeno al sitio de unión o el producto de acoplamiento puede modificarse genéticamente en el anticuerpo o antígeno de la invención a nivel del ADN. Los ADN se expresan entonces en un sistema huésped adecuado, y las proteínas expresadas se recogen y renaturalizan, si es necesario.

**[0113]** Se prefieren inmunoglobulinas sustancialmente puras de al menos aproximadamente 90 a 95% de homogeneidad, y lo más preferido de 98 a 99% o más de homogeneidad, para usos farmacéuticos. Una vez purificadas, parcialmente o hasta la homogeneidad, según se desee, los anticuerpos pueden usarse entonces terapéuticamente (incluyendo extracorporalmente) o en el desarrollo y realización de procedimientos de ensayo.

**[0114]** La presente invención también implica un procedimiento para producir células capaces de expresar un anticuerpo de la invención o su cadena o cadenas de inmunoglobulina correspondientes que comprende modificar genéticamente células con el polinucleótido o con el vector de la invención. Las células que pueden obtenerse mediante el procedimiento de la invención se pueden usar, por ejemplo, para probar la interacción del anticuerpo de la invención con su antígeno.

#### Ensayos de ELISA:

**[0115]** Los ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para diversos antígenos incluyen los basados en colorimetría, quimioluminiscencia, y fluorimetría. Los ELISAs se han aplicado con éxito en la determinación de bajas cantidades de fármacos y otros componentes antigénicos en muestras de plasma y orina, no implican etapas de extracción, y son fáciles de llevar a cabo. Los ELISA para la detección de anticuerpos para antígenos de proteína a menudo utilizan la unión directa de péptidos sintéticos cortos a la superficie de plástico de una placa de microtitulación. Los péptidos son, en general, muy puros debido a sus procedimientos de naturaleza sintética y de purificación eficientes utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento. Un inconveniente de los péptidos cortos es que normalmente representan epítopos lineales, pero no conformacionales o discontinuos. Para presentar epítopos conformacionales, se usan péptidos largos o la proteína nativa completa. La unión directa de los antígenos de proteína al soporte de poliestireno hidrófobo de la placa puede dar lugar a la desnaturalización parcial o total de la proteína unida y la pérdida de epítopos conformacionales. El recubrimiento de la placa con un anticuerpo, que media en la inmovilización (ELISA de captura) de los antígenos, puede evitar este efecto.

**[0116]** Sin embargo, con frecuencia, las proteínas recombinantes sobreexpresadas son insolubles y requieren purificación bajo condiciones de desnaturalización y renaturalización, cuando se van a analizar anticuerpos para epítopos conformacionales. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos Nº 20030044870 para un ELISA genérico utilizando proteínas de fusión recombinantes como proteínas de la cubierta.

#### Moléculas de unión:

**[0117]** Una "molécula de unión", tal como se usa en el contexto de la presente invención, se refiere a anticuerpos y fragmentos de los mismos, que se unen a IL-32γ.

#### Anticuerpos:

**[0118]** Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en el presente documento. Un anticuerpo o inmunoglobulina es una molécula de unión a una molécula de interés de la presente invención tal como se define anterior y posteriormente en el presente documento, que comprende al menos el dominio variable de una cadena pesada y normalmente comprende al menos los dominios variables de una cadena pesada y una cadena ligera. Las estructuras básicas de inmunoglobulinas en los sistemas de vertebrados se entienden relativamente bien. Véase, por ejemplo, Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed.

1988). Los términos "une" y "reconoce" se utilizan indistintamente con respecto a la afinidad de unión de las moléculas de unión de la presente invención, por ejemplo, anticuerpos.

**[0119]** Cualquier fragmento de anticuerpo o inmunoglobulina que contiene estructura suficiente para unirse específicamente a las moléculas de interés, tal como se define anterior y posteriormente en el presente documento, se indica en el presente documento de forma intercambiable como una "molécula de unión", "fragmento de unión" o un "fragmento inmunoespecífica."

**[0120]** Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos inmunoespecíficos, variantes, o derivados de los mismos de la invención incluyen anticuerpos monoclonales humanos y anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos de unión a epítipo, por ejemplo, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fv ligada a disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden un dominio V<sub>L</sub> o V<sub>H</sub> y fragmentos derivados de los mismos. Las moléculas scFv son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente US 5.892.019. A este respecto, el fragmento de unión al antígeno del anticuerpo puede ser también anticuerpos de dominio (dAb) también conocidos como anticuerpos de dominio único (sdAb) o nanobodies™ (Ablynx, Gent, Bélgica), véase, por ejemplo, De Haard et al., J. Bacteriol. 187 (2005), 4531-4541; Holt et al., Trends Biotechnol. 21 (2003), 484-490. Como se discutirá en más detalle a continuación, el término "inmunoglobulina" comprende diversas clases amplias de polipéptidos que se pueden distinguir bioquímicamente. Los expertos en la técnica entenderán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o epsilon, (γ, μ, α, δ, ε) con algunas subclases entre ellas (por ejemplo, γ1-γ4). Es la naturaleza de esta cadena la que determina la "clase" del anticuerpo como IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulina (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc. están bien caracterizadas y son conocidas por conferir especialización funcional. Las moléculas de inmunoglobulina o anticuerpo de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, etc.) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente discernibles para el experto en la materia en vista de la presente descripción y, en consecuencia, están dentro del alcance de la presente invención. Aunque todas las clases de inmunoglobulinas están claramente dentro del alcance de la presente invención, la siguiente discusión estará dirigida en general a la clase IgG de moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a la IgG, una molécula de inmunoglobulina estándar comprende dos polipéptidos de cadenas ligeras idénticas de peso molecular de aproximadamente 23.000 Daltons, y dos polipéptidos de cadena pesada idénticas de peso molecular 53.000-70.000. Las cuatro cadenas están típicamente unidas por enlaces disulfuro en una configuración en "Y" en donde las cadenas ligera agrupan las cadenas pesadas a partir de la boca de la "Y" y continúan a través de la región variable.

**[0121]** Como es evidente a partir de la clasificación de los anticuerpos anti-IL-32 de ejemplo de la presente invención listados en la Tabla 1 anterior, los anticuerpos de ejemplo de la presente invención son de la clase IgG3 o IgG1, posiblemente implicando respuestas de células T reguladoras y/o epitelios en su iniciación en estos estados con deficiencia de AIRE. Estos hallazgos son confirmados por la clasificación de los autoanticuerpos correspondientes que se encuentran en los ratones deficientes de AIRE descritos por Kärner et al., en Clin Exp. Immunol. (2012); doi: 10.1111/cei.12024. Por consiguiente, en una realización preferida de la presente invención, los anticuerpos de la presente invención son del tipo IgG, incluso más preferidas IgG3 o IgG1.

#### Estructura de IgG:

**[0122]** Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda (κ, λ). Cada clase de cadena pesada puede enlazarse con una cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligeras y pesadas se unen covalentemente entre sí, y las partes de "cola" de las dos cadenas pesadas se enlazan entre sí mediante enlaces de disulfuro covalentes o enlaces no covalentes, cuando las inmunoglobulinas se generan mediante hibridomas, células B o células huésped modificadas genéticamente. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácido van desde un extremo N terminal en los extremos en horquilla de la configuración Y hasta el extremo C en el final de cada cadena.

**[0123]** Tanto las cadenas ligeras como pesadas están divididas en regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se usan funcionalmente. A este respecto, se entenderá que los dominios variables tanto de las partes de cadena ligera (V<sub>L</sub>) como pesada (V<sub>H</sub>) determinan el reconocimiento y especificidad de antígeno. A la inversa, los dominios constantes de la cadena ligera (C<sub>L</sub>) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren propiedades biológicas importantes, tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión a receptor Fc, unión a complemento y similares. Por convención, la numeración de los dominios de región constante se incrementa al alejarse del sitio de unión a antígeno o extremo amino del anticuerpo. La parte N terminal es una región variable y en la parte C terminal está una región constante; los dominios CH3 y CL comprenden realmente el extremo carboxilo de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

**[0124]** Tal como se ha indicado anteriormente, la región variable permite al anticuerpo reconocer selectivamente y unirse específicamente a epítopos en antígenos. Es decir, el dominio V<sub>L</sub> y el dominio V<sub>H</sub>, o subconjunto de las regiones determinantes de complementariedad (CDR), de un anticuerpo se combinan para formar la región variable que define un sitio de unión a antígeno tridimensional. Esta estructura cuaternaria de anticuerpo forma el sitio de unión a antígeno presente en el extremo de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión a antígeno

está definido por tres CDR en cada una de las cadenas V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>. Cualquier fragmento de anticuerpo o inmunoglobulina que contiene estructura suficiente para unirse específicamente a una molécula de interés de la presente invención se indica en el presente documento indistintamente como un "fragmento de unión" o un "fragmento inmunoespecífico".

5

**[0125]** El anticuerpo de origen natural, un anticuerpo comprende seis regiones hipervariables, algunas veces llamadas "regiones determinantes de complementariedad" o "CDRs" presentes en cada dominio de unión a antígeno, las cuales son secuencias cortas, no contiguas, de los aminoácidos que se colocan de forma específica para formar el dominio de unión a antígeno dominio, ya que el anticuerpo asume su configuración tridimensional en un entorno acuoso. Las "CDRs" están flanqueadas por cuatro regiones de "estructura" o "FRs" relativamente conservadas, que muestran menos variabilidad intermolecular. Las regiones de estructura adoptan en gran parte una conformación de lámina β y las CDRs forman bucles que conectan, y en algunos casos, forman parte de la estructura de lámina β. Por lo tanto, las regiones de estructura actúan para formar un andamio que proporciona la colocación de las CDRs en una orientación correcta mediante interacciones no covalentes, intercadena. El dominio de unión a antígeno formado por las CDR colocadas define una superficie complementaria para el epítipo en el antígeno inmunorreactivo. Esta superficie de complementariedad promueve la unión no covalente del anticuerpo a su epítipo afín. Los aminoácidos que comprenden las CDRs y las regiones de estructura, respectivamente, pueden ser identificadas fácilmente para cualquier región variable de cadena pesada o ligera por un experto en la técnica, ya que han sido definidas de forma precisa; ver "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E., *et al.*, U.S. Department of Health and Human Services, (1983); y Chothia and Lesk, J. Mol. Biol, 196 (1987), 901-917.

**[0126]** En el caso en que existen dos o más definiciones de un término que se utiliza y/o acepta en la técnica, la definición del término tal como se utiliza en el presente documento pretende incluir todos de dichos significados a menos que se manifieste explícitamente lo contrario. Un ejemplo específico es el uso del término "región determinante de complementariedad ("CDR") para describir el antígeno no contiguo que combina sitios encontrados dentro de la región variable en polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera. Esta región particular ha sido descrita por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) y por Chothia and Lesk, J. Mol. Biol, 196 (1987), 901-917, donde las definiciones incluyen el solapamiento o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Sin embargo, la aplicación de cualquier definición para referirse a una CDR de un anticuerpo o variante del mismo pretende estar dentro del alcance del término, tal como se define y utiliza en el presente documento. Los residuos de aminoácido adecuados que comprenden las CDR, tal como se define a través de cada una de las referencias mencionadas anteriormente, se establecen a continuación en la tabla 2 como una comparación. Los números de residuos exactos que comprenden una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica pueden determinar en forma rutinaria qué residuos comprenden una región hipervariable particular o CDR del subtipo IgG humano del anticuerpo dada la secuencia de aminoácido de la región variable del anticuerpo.

**Tabla 2: Definiciones de CDR<sup>1</sup>**

	<b>Kabat</b>	<b>Chothia</b>
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

<sup>1</sup> La numeración de todas las definiciones de CDR de la Tabla 2 es de acuerdo a la convenciones de numeración expuestas por Kabat *et al.* (ver abajo).

**[0127]** Kabat *et al.* también definieron un sistema de numeración para secuencias de dominio variable que puede aplicar a cualquier anticuerpo. Un experto en la técnica puede asignar sin ambigüedad este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia de dominio variable, sin depender de cualquier dato experimental más allá de la propia secuencia. Tal como se utiliza en el presente documento, la "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración establecido por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). A menos que se especifique de otra manera, las referencias a la numeración de posiciones específicas de residuo de aminoácido en un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de la presente invención son según el sistema de numeración de Kabat, que, sin embargo, es teórica, y puede no aplicar de manera igual a cada anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, dependiendo de la posición de la primera CDR, las siguientes CDRs podrían desplazarse en cualquier dirección.

50

**[0128]** En una realización, el anticuerpo de la presente invención no es IgM o un derivado de la misma con una estructura pentavalente. En particular, en aplicaciones específicas de la presente invención, especialmente el uso terapéutico, las IgM son menos útiles que las IgG y otros anticuerpos bivalentes o moléculas de unión correspondientes, ya que las IgM debido a su estructura pentavalente y la falta de maduración de afinidad a menudo muestran reactividades cruzadas inespecíficas y muy baja afinidad.

55

**[0129]** En una realización particularmente preferida, el anticuerpo de la presente invención no es un anticuerpo policlonal, es decir, sustancialmente consiste en una especie de anticuerpo particular en lugar de ser una mezcla obtenida a partir de una muestra de inmunoglobulina de plasma.

5 Fragments de anticuerpos:

**[0130]** Los fragmentos de anticuerpos, incluyendo anticuerpos de cadena sencilla, pueden comprender la región o regiones variables solas o en combinación con la totalidad o una porción de los siguientes: región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. También se incluyen en la invención fragmentos de unión a una molécula de interés de la presente invención, comprendiendo dichos fragmentos cualquier combinación de región o regiones variables con una región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3.

**[0131]** Según la presente invención, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales de origen natural humanos o fragmentos de unión, derivados y variantes de los mismos clonados a partir de sujetos humanos, que se unen específicamente a IL-32γ específica, tal como se ha definido en detalle anterior y posteriormente, por ejemplo, en Tabla 1, las figuras, en particular las figuras 1 a 4 y en los ejemplos, por ejemplo, en los ejemplos 2 y 6.

**[0132]** Opcionalmente, la región de estructura del anticuerpo humano se alinea y adopta según las secuencias de región variables de línea germinal humana pertinentes en la base de datos; ver por ejemplo la Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) alojada por el MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, UK). Por ejemplo, los aminoácidos considerados por desviarse potencialmente de la secuencia de línea germinal real pueden deberse a las secuencias cebadoras de PCR incorporadas durante el proceso de clonación. En comparación con anticuerpos tipo humano generados de forma artificial, tal como fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla (scFvs) de una biblioteca de anticuerpo expresados en fago o ratones xenogéneos, el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención está caracterizado por (i) obtenerse utilizando la respuesta inmune humana en lugar de los sustitutos animales, es decir, el anticuerpo ha sido generado en respuesta a isotipos de IL-32 naturales en su conformación relevante en el cuerpo humano, (ii) tener protegido al individuo de o minimizar al menos significativamente la presencia de síntomas de una enfermedad, por ejemplo, SLE, y (iii) ya que el anticuerpo es de origen humano, se minimizan los riesgos de reactividad cruzada contra autoantígenos. Por lo tanto, según la presente invención, los términos “anticuerpo monoclonal humano”, “autoanticuerpo monoclonal humano”, “anticuerpo humano” y similares se utilizan para indicar una molécula de unión a IL-32 de un isotipo de IL-32 particular que es de origen humano, es decir, que ha sido aislada de una célula humana, tal como una célula B o hibridoma de la misma o el ADNc del cual ha sido clonado directamente a partir de ARNm de una célula humana, por ejemplo, una célula B de memoria humana. Un anticuerpo humano es aún considerado “humano”, incluso si las sustituciones de aminoácido se realizan en un anticuerpo (por ejemplo, para mejorar las características de unión).

**[0133]** Los anticuerpos derivados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas, y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, tal como se describe *infra*, y por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 5,939,598 de Kucherlapati *et al.*, están indicados como anticuerpos de tipo humano con el objeto de distinguirlos de los anticuerpos realmente humanos de la presente invención.

**[0134]** Por ejemplo, el emparejamiento de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos de tipo humano, tales como anticuerpos sintéticos y semisintéticos normalmente aislados de la expresión en fago, no reflejan necesariamente el emparejamiento original tal como tiene lugar en la célula B humana original. Por consiguiente, los fragmentos Fab y scFV obtenidos de bibliotecas de expresión recombinante como comúnmente se utilizan en la técnica anterior, pueden considerarse como artificiales con todos los posibles efectos asociados en la inmunogenicidad y estabilidad.

**[0135]** En cambio, la presente invención proporciona anticuerpos madurados por afinidad aislados de sujetos humanos seleccionados, que están caracterizados por su utilidad terapéutica.

50 Fragments de anticuerpos:

**[0136]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término “parte de cadena pesada” incluye secuencias de aminoácido derivadas de cadena pesada de inmunoglobulina. Un polipéptido que comprende una parte de cadena pesada comprende al menos una de: un dominio CH1, un dominio de articulación (por ejemplo, región de articulación superior, medio y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3, o una variante o fragmento del mismo. Por ejemplo, un polipéptido de unión para utilizarse en la presente invención puede comprender una cadena de polipéptido que comprende un dominio CH1; una cadena de polipéptido que comprende un dominio CH1, al menos una parte de un dominio de articulación, y un dominio CH2; una cadena de polipéptido que comprende un dominio CH1 y un dominio CH3; una cadena de polipéptido que comprende un dominio CH1, al menos una parte de un dominio de articulación, y un dominio CH3, o una cadena de polipéptido que comprende un dominio CH1, al menos una parte de un dominio de articulación, un dominio CH2 y un dominio CH3. En otra realización, un polipéptido de la presente invención comprende una cadena de polipéptido que comprende un dominio CH3. Además, un polipéptido de unión para utilizarse en la presente invención puede carecer de al menos una parte de un dominio CH2 (por ejemplo, toda o parte de un dominio CH2). Tal como se estableció anteriormente, quedará entendido por un experto en la técnica que estos dominios (por ejemplo, las partes de cadena pesada) pueden modificarse de modo que

varíen en la secuencia de aminoácido de la molécula de inmunoglobulina de origen natural.

**[0137]** En ciertos anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos aquí descritos, las partes de cadena pesada de una cadena de polipéptido de un multímero, son idénticas a una segunda  
5 cadena de polipéptido del multímero. Alternativamente, los monómeros que contienen una parte de cadena pesada de la presente invención no son idénticos. Por ejemplo, cada monómero puede comprender un sitio de unión a diana diferente, formando, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o diacuerpo.

**[0138]** En otra realización, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos  
10 aquí descritos están compuestos de una cadena de polipéptido simple, tal como scFvs y serán expresados en forma intracelular (intracuerpos) para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico potenciales *in vivo*.

**[0139]** Las partes de cadena pesada del polipéptido de unión para utilizarse en los procedimientos de diagnóstico y  
15 tratamiento aquí descritos pueden derivarse de moléculas de inmunoglobulina diferentes. Por ejemplo, una parte de cadena pesada de un polipéptido puede comprender un dominio CH1 derivado de una molécula IgG1, y una región bisagra derivada de una molécula IgG3. En otro ejemplo, una parte de cadena pesada puede comprender una región bisagra derivada, en parte, de una molécula IgG1, y en parte, de una molécula IgG3. En otro ejemplo, una parte de cadena pesada puede comprender una bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula IgG1, y en parte de una molécula IgG4.  
20

**[0140]** Así, como también se ejemplifica en los Ejemplos, en una realización, la región constante del anticuerpo de  
la presente invención o parte del mismo, en particular el CH2 y/o un dominio CH3, pero opcionalmente también el dominio CH1 es heteróloga a la región variable del anticuerpo monoclonal humano nativo aislado de acuerdo con el procedimiento de la presente invención. En este contexto, la región constante heteróloga (s) son preferiblemente de  
25 origen humano en el caso de aplicaciones terapéuticas de los anticuerpos de la presente invención, pero también podría ser de, por ejemplo origen roedor en el caso de los estudios en animales; véase también los Ejemplos.

**[0141]** Como se usa en este documento, el término "porción de cadena ligera" incluye secuencias de amino ácidos  
derivados de una cadena ligera de inmunoglobulina. Preferiblemente, la porción de cadena ligera comprende al  
30 menos uno de un dominio VL o CL.

**[0142]** Como se ha indicado anteriormente, las estructuras de las subunidades y configuración tridimensional de  
las regiones constantes de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Tal como se utiliza aquí, el término "V<sub>H</sub> dominio" incluye el amino terminal de dominio variable de una cadena pesada de inmunoglobulina y el  
35 término "CH1 dominio" incluye la primera (más amino terminal) constante dominio de la región de una cadena de inmunoglobulina pesada. El dominio CH1 es adyacente a la V<sub>H</sub> dominio y es amino terminal a la región de bisagra de una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina.

**[0143]** Tal como se utiliza aquí, el término "CH2 dominio" incluye la porción de una molécula de cadena pesada  
40 que se extiende, por ejemplo, desde aproximadamente el residuo 244 al residuo 360 de un anticuerpo utilizando esquemas de numeración convencionales (residuos 244 a 360, el sistema de numeración de Kabat; y residuos 231-340, sistema de numeración de la UE; véase Kabat EA et al, op cit)... El dominio CH2 es único en que no está estrechamente emparejado con otro dominio. Cadenas de carbohidratos ramificadas Más bien, dos unidos a N están interpuestas entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG nativa intacta. También está bien documentado  
45 que el dominio CH3 se extiende desde el dominio CH2 en el C-terminal de la molécula de IgG y comprende aproximadamente 108 residuos.

**[0144]** Como se usa en este documento, el término "región bisagra" incluye la porción de una molécula de cadena  
pesada que se une el dominio CH1 para el dominio CH2. Esta región bisagra comprende aproximadamente 25  
50 residuos y es flexible, permitiendo así que las dos regiones N-terminales de unión a antígeno se muevan independientemente. Regiones de bisagra se pueden subdividir en tres dominios distintos: superior, media, y los dominios de bisagra inferior; ver Roux et al., J. Immunol. 161 (1998), 4083.

**[0145]** Tal como se utiliza aquí, el término "enlace disulfuro" incluye el enlace covalente formado entre dos átomos  
55 de azufre. El amino cisteína ácido comprende un grupo tiol que puede formar un enlace disulfuro o un puente con un segundo grupo tiol. En la mayoría de las moléculas de IgG presentes en la naturaleza, las regiones CH1 y CL están unidos por un enlace disulfuro y las dos cadenas pesadas están unidas por dos enlaces disulfuro en posiciones correspondientes a 239 y 242 usando el sistema de numeración de Kabat (posición 226 o 229, el sistema de numeración de la UE).  
60

**[0146]** Como se usa en este documento, los términos "enlaces", "fusionado" o "fusión" se utilizan  
indistintamente. Estos términos se refieren a la unión de dos juntas más elementos o componentes, por cualquier  
medio, incluyendo conjugación química o medios recombinantes. Una "fusión en marco" se refiere a la unión de dos  
o más marcos de lectura de polinucleótidos abierta (ORFs) para formar un continuo ORF más largo, de manera que  
65 mantiene el marco de lectura traduccional correcto de los ORFs originales. Por lo tanto, una proteína de fusión recombinante es una proteína única que contiene dos o más segmentos que corresponden a polipéptidos

codificados por los ORFs original (que los segmentos no son normalmente tan unidas en la naturaleza). Aunque el marco de lectura se hace así continua a lo largo de los segmentos fusionados, los segmentos pueden ser físicamente o espacialmente separados por, por ejemplo, secuencia de unión en el marco. Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican las CDR de una región variable de la inmunoglobulina se pueden fusionar, en marco, pero estar separados por un polinucleótido que codifica la región marco al menos una inmunoglobulina o regiones adicionales de CDR, siempre que la "fusionado" CDR son co-traducido como parte de un polipéptido continuo. Por consiguiente, en una realización, el polinucleótido es un cDNA que codifica la región variable y al menos parte del dominio constante. En una realización, el polinucleótido es un cDNA que codifica la región variable y el dominio constante de un anticuerpo de la presente invención tal como se define en el presente documento.

10

Características de unión:

**[0147]** Por "unión" o "reconocimiento", usa de forma intercambiable en el presente documento, generalmente se entiende que una molécula de unión, por ejemplo, se une un anticuerpo a un epítipo predeterminado a través de su dominio de unión al antígeno, y que la unión conlleva algunas complementariedad entre el dominio y el epítipo de unión a antígeno. Según esta definición, se dice que un anticuerpo "se unen específicamente" a un epítipo cuando se une a ese epítipo, a través de su dominio de unión a antígeno más fácilmente de lo que sería unirse a un epítipo al azar, no relacionado. El término "especificidad" se usa aquí para calificar la afinidad relativa por el cual un cierto anticuerpo se une a un determinado epítipo. Por ejemplo, el anticuerpo "A" puede ser considerado que tienen una mayor especificidad para un epítipo dado que el anticuerpo "B", o anticuerpo "A" se puede decir que se unen a un epítipo "C" con una especificidad mayor del que tiene para el epítipo relacionado "RE". Epítipos no relacionados son generalmente parte de un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína, o cualquier otro polipéptido especificado), que puede ser utilizado para la estimación de la especificidad de unión de una molécula de unión dado. A este respecto, término "unión específica" se refiere a la unión del anticuerpo a un antígeno predeterminado con una  $K_D$  que es al menos dos veces menor que su  $K_D$  para la unión a un antígeno no específico. El término "altamente específica" de unión como se usa aquí, significa que la relación  $K_D$  del anticuerpo para el epítipo diana específico es al menos 10 veces menor que la  $K_D$  para la unión que el anticuerpo a otros ligandos.

**[0148]** Cuando está presente, el término "características de unión inmunológicas", u otras características de unión de un anticuerpo con un antígeno, en todas sus formas gramaticales, se refieren a la especificidad, afinidad, reactividad cruzada, y otras características de unión de un anticuerpo.

**[0149]** Por "preferentemente de unión", se entiende que la molécula de unión, por ejemplo, el anticuerpo se une específicamente a un epítipo más fácilmente de lo que sería unirse a un epítipo relacionado, similar, homóloga o análoga. Por lo tanto, un anticuerpo que "se une preferentemente" a un epítipo dado haría más probable que se unen a epítipo que a un epítipo relacionado, a pesar de que un anticuerpo de este tipo puede reacción cruzada con el epítipo relacionado. En relación con determinadas antígenos, tales como específico IL-32 isotipos el término "preferentemente de unión" significa que la molécula de unión, por ejemplo, el anticuerpo se une específicamente a un isotipo IL-32 más fácilmente de lo que sería unirse a una relacionada, similar, homóloga, o análogos de IL-32 isotipos.

**[0150]** A modo de ejemplo no limitativo, una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo puede ser considerado para unirse a un primer epítipo preferentemente si se enlaza con dicho primer epítipo con constante de disociación ( $K_D$ ) que es menor que  $K$  del anticuerpo  $D$  para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, un anticuerpo puede ser considerado para unirse a un primer antígeno preferentemente si se une a la primera epítipo con una afinidad que es al menos un orden de magnitud menor que la del anticuerpo  $K_D$  para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, un anticuerpo puede ser considerado para unirse a un primer epítipo preferentemente si se une a la primera epítipo con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud menor que la del anticuerpo  $K_D$  para el segundo epítipo.

50

**[0151]** En otro ejemplo no limitante, una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo puede ser considerado para unirse a un primer epítipo preferentemente si se une a la primera epítipo con un descuento sobre el precio ( $k$  (off)) que es menor que  $k$  del anticuerpo (off) para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, un anticuerpo puede ser considerado para unirse a un primer epítipo preferentemente si se une a la primera epítipo con una afinidad que es al menos un orden de magnitud menor que  $k$  del anticuerpo (desactivado) para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, un anticuerpo puede ser considerado para unirse a un primer epítipo preferentemente si se une a la primera epítipo con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud menor que  $k$  del anticuerpo (desactivado) para el segundo epítipo.

**[0152]** Una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo o antígeno-fragmento de unión, variante, o derivado según la invención puede decirse que se une una molécula de interés de la presente invención, un fragmento o variante de la misma con una velocidad de disociación ( $k$  (off)) de menos de o igual a  $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$  o  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . Más preferiblemente, un anticuerpo de la invención puede decirse que unirse una molécula de interés de la presente invención o un fragmento o variante del mismo con un descuento sobre el precio ( $k$  (off)) de menos de o igual a  $5 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ ,  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , o  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ,  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  o  $10^{-7} \text{ s}^{-1}$ .

65

**[0153]** Una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo o de unión a antígeno fragmento, variante, o derivado según la invención puede decirse que se une una molécula de interés de la presente invención o un fragmento o variante de la misma con una sobre la tasa ( $k$  (en )) de más de o igual a  $10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  o  $5 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Más preferiblemente, un anticuerpo de la invención puede decirse que unirse una molécula de interés de la presente invención o un fragmento o variante de la misma con una sobre la tasa ( $k$  (a)) mayor que o igual a  $10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , o  $5 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  o  $10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

**[0154]** Una molécula de unión, por ejemplo, se dice que un anticuerpo para la unión de un anticuerpo de referencia a un epítipo dado si éste se une preferentemente a ese epítipo en la medida en que bloquea, en algún grado, la unión del anticuerpo de referencia para la inhibir competitivamente epítipo. La inhibición competitiva puede ser determinada por cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, la competencia ensayos ELISA. Un anticuerpo se puede decir que la unión del anticuerpo de referencia a un epítipo dado por al menos 90% de inhibición competitiva, al menos 80%, al menos 70%, al menos 60%, o al menos 50%.

**[0155]** Como se usa en este documento, el término "afinidad" se refiere a una medida de la fuerza de la unión de un epítipo individual con la CDR de una molécula de unión, por ejemplo, una molécula de inmunoglobulina; véase, por ejemplo, Harlow y otros, Anticuerpos: Un manual de laboratorio, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988) en las páginas 27-28. Tal como se utiliza aquí, el término "avidez" se refiere a la estabilidad global del complejo entre una población de inmunoglobulinas y un antígeno, es decir, la fuerza que combina funcional de una mezcla de inmunoglobulina con el antígeno; véase, por ejemplo, Harlow en las páginas 29-34. Avidez está relacionada tanto con la afinidad de las moléculas de inmunoglobulina individuales en la población con epítopos específicos, y también las valencias de las inmunoglobulinas y el antígeno. Por ejemplo, la interacción entre un anticuerpo monoclonal bivalente y un antígeno con una estructura epítipo altamente repetición, tal como un polímero, sería uno de alta avidez. La afinidad o avidez de un anticuerpo para un antígeno se puede determinar experimentalmente usando cualquier procedimiento adecuado; véase, por ejemplo, Berzofsky et al., "antígeno-anticuerpo Interacciones" En Fundamental Immunology, Paul, WE, ed., Raven Press New York, NY (1984), Kubly, Janis Inmunología, WH Freeman and Company de Nueva York, Nueva York (1992), y los procedimientos descritos en el mismo. Las técnicas generales para la medición de la afinidad de un anticuerpo por un antígeno incluyen ELISA, RIA, y resonancia de plasmón superficial. La afinidad medida de una interacción anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide en diferentes condiciones, por ejemplo, concentración de sal, pH. Por lo tanto, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión a antígeno, por ejemplo,  $K_D$ ,  $IC_{50}$ , se hacen preferiblemente con soluciones normalizadas de anticuerpo y antígeno, y un tampón estandarizado. Las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención también pueden describirse o especificarse en términos de su reactividad cruzada. Tal como se utiliza aquí, el término "reactividad cruzada" se refiere a la capacidad de un anticuerpo, específico para un antígeno, para reaccionar con un segundo antígeno; una medida de la relación entre dos sustancias antigénicas diferentes. Por lo tanto, un anticuerpo es reactivo cruz si se une a un epítipo distinto del que indujo su formación. El epítipo de reacción cruzada generalmente contiene muchas de las mismas características estructurales complementarias como el epítipo que induce, y en algunos casos, puede encajar realmente mejor que la original.

**[0156]** Por ejemplo, ciertos anticuerpos tienen algún grado de reactividad cruzada, en que se unen a epítopos relacionados, pero no idénticos, por ejemplo, epítopos con al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80 %, al menos 75%, al menos 70%, al menos 65%, al menos 60%, al menos 55%, y al menos 50 % de identidad (tal como se calcula usando procedimientos conocidos en la técnica y se describe en este documento) con un epítipo de referencia. Un anticuerpo puede decirse que tiene poca o ninguna reactividad cruzada si no se une a epítopos con menos de 95%, menos de 90%, menos de 85%, menos de 80%, menos de 75%, menos de 70%, menos de 65%, menos de 60%, menos de 55%, y menos de 50% de identidad (tal como se calcula usando procedimientos conocidos en la técnica y se describe en este documento) con un epítipo de referencia. Un anticuerpo puede ser considerado "altamente específica" para un determinado epítipo, si no se une a cualquier otro análogo, ortólogo u homólogo de ese epítipo.

**[0157]** Las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención también pueden describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión a una molécula de interés de la presente invención. Las afinidades de unión preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación o  $K_D$  de menos de  $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ ,  $10^{-2} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $10^{-3} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $10^{-4} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ,  $10^{-5} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ,  $10^{-6} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ ,  $10^{-7} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $10^{-8} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ ,  $10^{-9} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-10} \text{ M}$ ,  $10^{-10} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-11} \text{ M}$ ,  $10^{-11} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-12} \text{ M}$ ,  $10^{-12} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-13} \text{ M}$ ,  $10^{-13} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-14} \text{ M}$ ,  $10^{-14} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-15} \text{ M}$ , o  $10^{-15} \text{ M}$ . Típicamente, el anticuerpo se une con una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $10^{-7} \text{ M}$  o menos a su antígeno predeterminado. Preferiblemente, el anticuerpo se une a su antígeno afín con una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $10^{-9} \text{ M}$  o menos y aún más preferiblemente con una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $10^{-11} \text{ M}$  o menos.

#### Modificaciones de anticuerpos:

**[0158]** La inmunoglobulina o sus ADNc codificantes puede modificarse adicionalmente. Por lo tanto, en una realización adicional, el procedimiento de la presente invención comprende una cualquiera de la etapa o etapas de producción de un anticuerpo quimérico, anticuerpo de cadena sencilla, fragmento Fab, anticuerpo biespecífico,



anticuerpo de fusión, anticuerpo marcado o un análogo de cualquiera de estos. Los procedimientos correspondientes son conocidos por la persona experta en la técnica y se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. Como se discutió anteriormente, el anticuerpo de la invención puede existir en una variedad de formas además de anticuerpos completos; incluyendo, 5 por ejemplo, Fv, Fab y F(ab)<sub>2</sub>, así como en cadenas sencillas; véase, por ejemplo, el documento la solicitud internacional WO/09344.

**[0159]** Los anticuerpos de la presente invención o su(s) correspondiente(s) cadena(s) de inmunoglobulina se pueden modificar adicionalmente usando técnicas convencionales conocidas en el sector, por ejemplo, mediante la 10 utilización de delección o delecciones, inserción o inserciones, sustitución o sustituciones, adición o adiciones y/o recombinación o recombinaciones de aminoácidos y/o cualquier otra modificación o modificaciones conocidas en la técnica, ya sea solas o en combinación. Los procedimientos para introducir tales modificaciones en la secuencia de ADN subyacente a la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina son bien conocidos para el experto en la técnica; véase, por ejemplo, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor 15 Laboratory (1989) Nueva York y Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, NY (1994). Las modificaciones del anticuerpo de la invención incluyen derivatizaciones químicas y/o enzimáticas en uno o más aminoácidos constituyentes, incluyendo modificaciones de las cadenas laterales, modificaciones del esqueleto, y modificaciones N-terminales y C-terminales, incluyendo acetilación, hidroxilación, metilación, amidación, y la unión de restos de hidratos de carbono o lípidos, cofactores, y similares. Del mismo 20 modo, la presente invención abarca la producción de proteínas quiméricas que comprenden el anticuerpo descrito o algún fragmento del mismo en el amino terminal fusionado a una molécula heteróloga, tal como una etiqueta o un medicamento. Las moléculas de unión de antígeno generadas de esta manera se pueden usar para la localización de fármacos a células que expresan las estructuras de superficie apropiadas de las células y tejidos enfermos, respectivamente. Este reconocimiento y unión a células podría ser útil para el suministro de agentes 25 terapéuticamente o diagnósticamente activos y de suministro de genes/terapia génica. Moléculas/partículas con un anticuerpo de la invención se unirían específicamente a células/tejidos que expresan el antígeno particular de interés, y por lo tanto podrían tener un uso diagnóstico y terapéutico.

Muestras:

30 **[0160]** Tal como se utiliza aquí, el término "muestra" o "muestra biológica" se refiere a cualquier material biológico obtenido de un sujeto o paciente. En un aspecto, una muestra puede comprender sangre, líquido cefalorraquídeo ("CSF"), o la orina. En otros aspectos, una muestra puede comprender sangre, plasma, células mononucleares enriquecidas de sangre periférica (PBMC), tales como linfocitos (es decir, células T, células NK o células B) enteros, 35 monocitos, macrófagos, células dendríticas y basófilos; y células cultivadas (por ejemplo, células B de un sujeto). Una muestra también puede incluir una biopsia o muestra de tejido, incluyendo tejido tumoral. En todavía otros aspectos, una muestra puede comprender células enteras y/o un lisado de las células. En una realización, una muestra comprende células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las muestras se pueden recoger por procedimientos conocidos en la técnica.

40 Identificación de los anticuerpos anti-IL-32, aislamiento de células B y la expresión recombinante de anticuerpos anti-IL-32 correspondientes:

**[0161]** La identificación de las células B específica para los anti IL--32 anticuerpos de la presente invención, como 45 se alistó en la Tabla 1, y como a modo de ejemplo se muestra en el respeto del isotipo IL-32γ y la clonación molecular de los anticuerpos exhiben especificidad de interés como así como su expresión recombinante y caracterización funcional puede realizarse generalmente como se describe en las solicitudes internacionales WO 2013/098419 A1 y WO 2013/098420 A1; ver secciones Ejemplos en el mismo, en particular, los Ejemplos 1 y 2 en las páginas 118 a 120 del documento WO 2013/098419 A1 y los Ejemplos 1 a 4 de las páginas 27 a 31 del 50 documento WO 2013/098420 A1.

**[0162]** En resumen, en una realización de la presente invención, los cultivos de células B individuales o oligoclonales se cultivaron y el sobrenadante del cultivo, que contiene anticuerpos producidos por dichas células B se proyectó para la presencia y la afinidad de anticuerpos específicos para uno o más de los isotipos de IL-32, como 55 se describe en los Ejemplos. En otra realización, los sueros de pacientes se seleccionaron primero por la presencia de autoanticuerpos contra la IL-32 isotipos y entonces aquellos con alto título fueron seleccionados para la sangre periférica células mononucleares de aislamiento; véase el Ejemplo 2 en las páginas 118-120 del documento WO 2013/098419 A1. El proceso de detección comprende la detección de la unión de fragmentos, péptidos o derivados de la IL-32 isotipos. Posteriormente, el anticuerpo para el que la unión se detecta o se aislaron la célula que produce 60 dicho anticuerpo; véase el Ejemplo 3 en la página 120 del documento WO 2013/098419 A1. Por lo tanto, una pantalla preliminar se puede realizar en un panel de donantes de candidatos, utilizando muestras que contienen células secretoras de anticuerpos (tales como sangre periférica total o suero). En particular, las células mononucleares se pueden aislar de sangre u otros tejidos linfáticos usando técnicas estándar de separación para aislar las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), tales como centrifugación en gradiente. Después de 65 y/o antes de esta etapa de separación, las muestras de suero (o plasma), los sobrenadantes de cultivo de células, o las células (obtenidas a partir de diferentes pacientes, de diferentes tejidos, y/o en diferentes puntos de tiempo)

pueden ser preseleccionadas usando tecnologías estándar para detectar la presencia de anticuerpos y células secretoras de anticuerpos (por ejemplo ELISA, BIACORE, Western blot, FACS, Serpa, matrices de antígeno, la neutralización de la infección viral en un sistema de cultivo de células, o ensayos ELISPOT). La literatura proporciona varios ejemplos de estas tecnologías que muestran, por ejemplo, el uso de ELISPOT para la

- 5 caracterización de la respuesta inmunitaria en los donantes vacunados (Crotty y col., Immunol Meth. 286 (2004), 111-122), el uso de microarrays de antígeno como herramientas de diagnóstico para pacientes recientemente infectados (Mezzasoma et al., Clin Chem. 48 (2002), 121-130, y otras tecnologías para la medición de las respuestas inmunitarias específicas de antígeno (Kern et al., Trends Immunol. 26 (2005), 477- 484).
- 10 **[0163]** Después de la identificación de anticuerpos anti-IL-32 candidato anticuerpos y las células B secretoras de ellos, respectivamente, la secuencia de ácido nucleico que codifica se obtiene el anticuerpo de interés, que comprende las etapas de preparación de una célula B y la obtención/secuenciación de ácidos nucleicos a partir de la
- 15 células B que codifica el anticuerpo de interés y la inserción aún más el ácido nucleico en o usando el ácido nucleico para preparar un huésped de expresión que puede expresar el anticuerpo de interés, cultivando o sub-cultivo del huésped de expresión bajo condiciones en las que se expresa el anticuerpo de interés y, opcionalmente, purificar el anticuerpo de interés. Huelga decir que el ácido nucleico puede ser manipulado en el medio para introducir sitios de restricción, para cambiar el uso de codones, y/o para añadir o secuencias reguladoras de la transcripción optimizar y/o traducción. Estas técnicas son estado de la técnica y pueden ser realizadas por la persona experta en la técnica sin carga indebida. Por ejemplo, la región constante de cadena pesada puede ser intercambiada por la de un isotipo
- 20 diferente o se elimina por completo. Las regiones variables pueden ser unidas para codificar regiones Fv de cadena sencilla. Múltiples regiones Fv se pueden vincular a la capacidad de unión confieren a más de una diana o pesada quimérica y combinaciones de cadena ligera se pueden emplear. Una vez que el material genético está disponible, el diseño de análogos como se describe anteriormente que conservan tanto su capacidad para unirse a la diana deseada es sencillo. Los procedimientos para la clonación de regiones variables de anticuerpos y generación de
- 25 anticuerpos recombinantes son conocidos por la persona experta en la técnica y se describen, por ejemplo, en Gilliland et al, Tissue Antigens 47 (1996), 1-20.; Doenecke et al., Leukemia 11 (1997), 1787-1792. En una realización preferida de la presente invención, sin embargo, se obtienen células B y el anticuerpo correspondiente se expresa por los procedimientos descritos en la solicitud internacional WO 2013/098420 A1, en particular en el Ejemplo 3, en las páginas 28-30.

30

Enfermedades y trastornos:

- [0164]** A menos que se indique lo contrario, los términos "trastorno" y "enfermedad" se usan indistintamente en este documento. El término "trastorno autoinmune" como se usa en el presente documento es una enfermedad o
- 35 trastorno que surge de y dirigidos contra los propios tejidos u órganos de un individuo o un co-segregar o manifestación de los mismos o resultante condición del mismo. Las enfermedades autoinmunes son causadas principalmente por la desregulación de las respuestas y autoanticuerpos inmunitarias adaptativas o células T autorreactivas contra la auto-estructuras están formadas. Casi todas las enfermedades autoinmunes tienen un componente inflamatorio, también. Enfermedades autoinflamatorias son principalmente inflamatoria, y algunas
- 40 enfermedades autoinflamatorias clásicos son causadas por defectos genéticos en las vías inflamatorias innatas. En las enfermedades autoinflamatorias, no se encuentran células T autorreactivas o autoanticuerpos. En muchos de estos trastornos autoinmunes y autoinflamatorias, puede existir un número de marcadores clínicos y de laboratorio, incluyendo, pero no limitado a, hipergammaglobulinemia, niveles elevados de autoanticuerpos, depósitos de complejos antígeno-anticuerpo en los tejidos, se benefician de los tratamientos con corticosteroides o
- 45 inmunosupresores, y linfocitos agregados de células en los tejidos afectados. Sin limitarse a una teoría con respecto a enfermedad autoinmune mediada por células B, se cree que las células B demuestran un efecto patogénico en enfermedades autoinmunes humanas a través de una multitud de rutas mecánicas, incluyendo la producción de autoanticuerpos, la formación del complejo inmune, dendríticas y la activación de las células T, la síntesis de citocinas, la liberación de quimiocinas directa, y proporcionar un nido para la ectópico neo-linfogénesis. Cada una de
- 50 estas vías pueden participar en diferentes grados en la patología de enfermedades autoinmunes.

- [0165]** Como se usa en este documento, un "trastorno autoinmune" puede ser una enfermedad de órgano-específico (es decir, la respuesta inmunitaria se dirige específicamente contra un sistema de órganos tales como el sistema endocrino, el sistema hematopoyético, la piel, el sistema cardiopulmonar, el sistemas gastrointestinales y del
- 55 hígado, el sistema renal, la tiroides, las orejas, el sistema neuromuscular, el sistema nervioso central, etc.) o una enfermedad sistémica que puede afectar a múltiples sistemas de órganos incluyendo pero no limitado a lupus eritematoso sistémico (SLE), reumatoide artritis, polimiositis, síndrome autoinmune tipo poliendocrinopatía 1 (APS1)/poliendocrinopatía autoinmune-candidiasis-distrofia ectodérmica (APECED) etc. preferidos de tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a esclerosis múltiple (MS), diversas formas de trastornos reumatológicos
- 60 autoinmunes incluyendo pero no limitado a la artritis reumatoide, espondiloartritis, artritis psoriásica, síndrome de Sjogren, esclerodermia, lupus, incluyendo pero no limitado a LES y nefritis por lupus, p olymiositis/dermatomiositis y artritis psoriásica), trastornos dermatológicos autoinmunes (incluyendo pero no limitado a la psoriasis, las enfermedades del grupo pénfigo, enfermedades penfigoide bulloso, y lupus eritematoso cutáneo), y trastornos endocrinos autoinmunes (incluyendo pero no limitado a enfermedades autoinmunes relacionadas con la diabetes
- 65 tales como de tipo 1 o diabetes mellitus insulino dependiente (T1DM o IDDM), enfermedad tiroidea autoinmune (incluyendo pero no limitado a la enfermedad y la tiroiditis de Graves)) y las enfermedades que afectan a la

generación de la autoinmunidad incluyendo, pero no limitado a, el síndrome de poliendocrinopatía autoinmune de tipo 1 (APS1)/autoinmune distrofia poliendocrinopatía-candidiasis-ectodérmica (APECED) miastenia gravis (MG/Timoma).

- 5 **[0166]** Las enfermedades preferidas incluyen, por ejemplo, SLE, RA, espondiloartritis, artritis psoriásica, DMT1, MS, psoriasis, síndrome de Sjogren, enfermedad de Graves, tiroiditis, y la glomerulonefritis, y APS 1. Aún más preferidos son RA, SLE, y MS, y SLE mayormente preferido.

Marcadores y agentes de diagnóstico:

10

- [0167]** Los agentes de marcaje se pueden acoplar ya sea directamente o indirectamente a los anticuerpos o antígenos de la invención. Un ejemplo de acoplamiento indirecto es mediante el uso de un resto espaciador. Además, los anticuerpos de la presente invención pueden comprender un dominio adicional, estando dicho dominio unido por enlaces covalentes o no covalentes. La unión puede basarse en la fusión genética según los procedimientos conocidos en la técnica y descritos anteriormente o puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, reticulación química, tal como se describe en, por ejemplo, en la solicitud internacional WO94/04686. El dominio adicional presente en la proteína de fusión que comprende el anticuerpo de la invención puede preferentemente estar unido por un enlazador flexible, ventajosamente un enlazador polipéptido, en donde dicho enlazador polipéptido comprende aminoácidos unidos a péptidos plurales, hidrófilos de una longitud suficiente para abarcar la distancia entre el extremo C-terminal de dicho dominio adicional y el extremo N-terminal del anticuerpo de la invención o viceversa. El agente terapéutica o diagnósticamente activo puede acoplarse al anticuerpo de la invención o un fragmento de unión a antígeno del mismo mediante diversos medios. Estos incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión de cadena única que comprenden las regiones variables del anticuerpo de la invención acopladas por procedimientos covalentes, tales como enlaces peptídicos, al agente terapéutica o diagnósticamente activo. Otros ejemplos incluyen moléculas que comprenden al menos un fragmento de unión al antígeno acoplado a moléculas adicionales de forma covalente o no covalente incluyendo los de la siguiente lista no limitativa ilustrativa. Traunecker, Int. J. Cancer Surp. SuDP 7 (1992), 51-52, describen el reactivo biespecífico janusina en el que la región Fv dirigida a CD3 está acoplada a CD4 soluble o a otros ligandos, tales como OVCA e IL-7. Del mismo modo, las regiones variables del anticuerpo de la invención pueden construirse en moléculas Fv y acoplarse a ligandos alternativos, tales como los ilustrados en el artículo citado. Higgins, J. Infect. Disease 166 (1992), 198-202, describieron un anticuerpo heteroconjugado compuesto de OKT3 reticulado a un anticuerpo dirigido a una secuencia específica en la región V3 de GP120. Tales anticuerpos heteroconjugados también pueden construirse usando al menos las regiones variables contenidas en el anticuerpo de los procedimientos de la invención. Los ejemplos adicionales de anticuerpos específicos incluyen los descritos por Fanger Treat, Cancer. Res. 68 (1993), 181-194 y por Fanger, Crit. Rev. Immunol. 12 (1992), 101-124. Los conjugados que son inmunotoxinas que incluyen anticuerpos convencionales han sido ampliamente descritos en la técnica. Las toxinas se pueden acoplar a los anticuerpos mediante técnicas de acoplamiento convencionales o las inmunotoxinas que contienen partes de toxina de proteína se pueden producir como proteínas de fusión. Los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar de una manera correspondiente para obtener tales inmunotoxinas. Las ilustrativas de tales inmunotoxinas son las descritas por Byers, Seminars Cell. Biol. 2 (1991), 59-70 y por Fanger, Immunol. Hoy 12 (1991), 51-54.

- [0168]** La proteína de fusión descrita anteriormente puede comprender además un enlazador escindible o un sitio de escisión para proteinasas. Estos restos espaciadores, a su vez, pueden ser insolubles o solubles (Diener et al., Science 231 (1986), 148) y pueden seleccionarse para permitir la liberación del fármaco desde el antígeno en el sitio diana. Ejemplos de agentes terapéuticos que pueden acoplarse a los anticuerpos y los antígenos de la presente invención para la inmunoterapia son quimiocinas, moléculas mensajeras, fármacos, radioisótopos, lectinas y toxinas. Los fármacos que se pueden conjugar a los anticuerpos y antígenos de la presente invención dependen del contexto de la enfermedad en el que las moléculas conjugadas pretenden utilizarse. Por ejemplo, anticuerpos específicos para dianas útiles en el tratamiento de enfermedades tumorales se pueden conjugar a compuestos que son referidos clásicamente como fármacos antineoplásicos, tales como mitomicina C, daunorubicina, y vinblastina. En el uso de anticuerpos o antígenos de la invención radioisotópicamente conjugados para, por ejemplo, la inmunoterapia tumoral, ciertos isótopos pueden ser más preferibles que otros dependiendo de factores, tales como la distribución de leucocitos, así como la estabilidad y la emisión. Dependiendo de la respuesta autoinmune, algunos emisores pueden ser preferibles a otros. En general, se prefieren radioisótopos emisores de partículas  $\alpha$  y  $\beta$  en inmunoterapia. Los preferidos son emisores  $\alpha$  de alta energía de corto alcance, tales como  $^{212}\text{Bi}$ . Ejemplos de radioisótopos que se pueden unir a los anticuerpos o antígenos de la invención con fines terapéuticos son  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{At}$ ,  $^{211}\text{Pb}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{109}\text{Pd}$  y  $^{188}\text{Re}$ . Otros agentes terapéuticos que se pueden acoplar al anticuerpo o antígeno de la invención, así como protocolos terapéuticos ex vivo e in vivo, son conocidos, o se pueden determinar fácilmente, por los expertos en la técnica. Ejemplos de radionúcleidos adecuados para el marcaje no son limitantes  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{197}\text{Hg}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{113\text{m}}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{127}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{203}\text{Pb}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{153}\text{Sm}$  y  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Otras moléculas adecuadas para el marcaje son un colorante fluorescente o luminiscente, una partícula magnética, un metal, y una molécula que se puede detectar a través de una etapa enzimática o de unión secundaria, tal como una etiqueta de enzima o de péptido. Sondas fluorescentes comerciales adecuadas para su uso como marcadores en la presente invención se enumeran en el Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 8ª Edición. Las partículas magnéticas adecuadas para su uso en ensayos basados en partículas magnéticas (AMPs) se pueden seleccionar de materiales

paramagnéticos, diamagnéticos, ferromagnéticos, ferromagnéticos y superparamagnéticas.

**[0169]** Los procedimientos generales de la bioquímica molecular y celular útiles para fines de diagnóstico se pueden encontrar en libros de texto estándar tales como *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª Ed. (Sambrook et al, Harbor Laboratory Press 2001.); *Short Protocols in Molecular Biology*, 4ª ed. (Ausubel et al eds, John Wiley & Sons 1999); *Protein methods* (Bollag et al., John Wiley & Sons 1996). Los reactivos, medios de detección y kits para fines de diagnóstico están disponibles de proveedores comerciales, tales como Pharmacia Diagnostics, Amersham, BioRad, Stratagene, Invitrogen, y Sigma-Aldrich, así como de las fuentes proporcionadas en una cualquiera de las referencias citadas en el presente documento, en particular la literatura de patentes .

10

Tratamiento y fármacos:

**[0170]** Tal como se usa en este documento, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, donde el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico indeseado, tal como el desarrollo de una enfermedad autoinmune y/o enfermedad autoinflamatoria. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estabilización (es decir, no empeoramiento) de la enfermedad, retraso o ralentización de progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad, y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Los que están en necesidad de tratamiento incluyen aquellos que ya presentan la afección o trastorno, así como aquellos propensos a tener la afección o trastorno o aquellos en los que se debe prevenir la manifestación de la afección o trastorno.

**[0171]** Si no se indica lo contrario, el término "fármaco", "medicina" o "medicamento" se usan indistintamente en el presente documento e incluirán, pero no se limita a, todos los (A) artículos, medicinas y preparaciones para uso interno o externo, y cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a ser utilizadas para el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de la enfermedad de cualquier hombre u otros animales; y (B) artículos, medicinas y preparaciones (distintas de los alimentos) destinados a afectar a la estructura o cualquier función del cuerpo del hombre u otros animales; y (c) artículos destinados a su uso como un componente de cualquier artículo especificado en la cláusula (A) y (B). El término "fármaco", "medicina" o "medicamento" incluirá la fórmula completa de la preparación para uso ya sea en hombre o en otros animales que contienen uno o más "agentes", "compuestos", "sustancias" o "composiciones (químicas)" tal cual y en algún otro contexto también otros excipientes farmacéuticamente inactivos, tales como cargas, disgregantes, lubricantes, deslizantes, aglutinantes o que aseguran un fácil transporte, disgregación, desagregación, disolución y disponibilidad biológica del "fármaco", "medicina", o "medicamento" en un lugar diana previsto dentro del cuerpo del hombre u otros animales, por ejemplo, en la piel, en el estómago o el intestino. Los términos "agente", "compuesto" o "sustancia" se usan indistintamente en este documento y deben incluir, en un contexto más particular, pero no se limitan a, todos los agentes farmacológicamente activos, es decir, agentes que inducen un efecto biológico o farmacológico deseado o se investigan o prueban en la capacidad de inducir dicho posible efecto farmacológico mediante los procedimientos de la presente invención.

**[0172]** Ejemplos de "fármacos antirreumáticos" y fármacos inmunosupresores incluyen cloroquina, hidroxicloloroquina, miocrisina, auranofm, sulfasalazina, metotrexato, leflunomida, etanercept, infliximab (más metotrexato oral y subcutáneo), adalimumab etc., azatioprina, D-penicilamina, sales de oro (oral), sales de oro (intramuscular), minociclina, ciclosporina, incluyendo ciclosporina A y ciclosporina tópica, tacrolimus, micofenolato mofetilo, ciclofosfamida, proteína A estafilocócica (Goodyear y Silverman, J. Exp. Med., 197 (2003), 125-39), incluyendo sales y derivados de los mismos, etc.

**[0173]** Los ejemplos de "fármacos anti-inflamatorios no esteroideos" o "AINEs" incluyen aspirina, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno e ibuprofeno retardado, fenoprofeno, piroxicam, flurbiprofeno, naproxeno, ketoprofeno, naproxeno, tenoxicam, benorilato, diclofenaco, naproxeno, nabumetona, indometacina, ketoprofeno, ácido mefenámico, diclofenac, fenbufeno, azapropazona, acemetacina, ácido tiaprofénico, indometacina, sulindac, tolmetina, fenilbutazona, diclofenaco y diclofenaco retardado, inhibidores de ciclooxigenasa (COX)-2, tales como GR 253035, MK966, celecoxib (CELEBREX®; 4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-ilo), bencenosulfonamida y valdecoxib (BEXTRA®) y meloxicam (MOBIC®), incluyendo sales y derivados de los mismos, etc. Preferiblemente, son aspirina, naproxeno, ibuprofeno, indometacina, o tolmetina. Dichos AINE se utilizan opcionalmente con un analgésico, tal como codenina, tramadol, y/o dihidrocodinina o narcóticos, tales como la morfina.

**[0174]** Por "sujeto" o "individuo" o "animal" o "paciente" o "mamífero", se entiende cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, por ejemplo, un paciente humano, para los cuales se desea el diagnóstico, pronóstico, prevención o terapia.

Portadores farmacéuticos:

**[0175]** Los portadores farmacéuticamente aceptables y vías de administración se pueden tomar de la literatura conocida por la persona experta en la técnica correspondiente. Las composiciones farmacéuticas de la presente

invención se pueden formular de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica; véase por ejemplo Remington: La Ciencia y la Práctica de la Farmacia (2000) por la Universidad de Ciencias de Filadelfia, ISBN 0-683-306472, Protocolos vacuna. 2ª Edición por Robinson et al, Humana Press, Totowa, Nueva Jersey, EE.UU., 2003; Banga, Therapeutic péptidos y proteínas: Formulación, procesamiento y sistemas de entrega. 2ª Edición por Taylor y Francis. (2006), ISBN: 0-8493-1630-8. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden tales vehículos se pueden formular por el conocido procedimientos convencionales. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar al sujeto en una dosis adecuada. La administración de las composiciones adecuadas puede efectuarse por diferentes caminos. Ejemplos incluyen la administración de una composición que contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable por vía oral, intranasal, rectal, tópica, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, subdérmica, transdérmica, intratecal, y los procedimientos intracraneales. Las formulaciones en aerosol, tales como formulaciones de pulverización nasal incluyen soluciones acuosas purificadas de otro tipo del agente activo con agentes conservantes y agentes isotónicos. Tales formulaciones se ajustan preferiblemente a un pH y estado isotónico compatible con las membranas mucosas nasales. Las composiciones farmacéuticas para administración oral, tales como moléculas anticuerpo de dominio único (por ejemplo, "nanocuerpos™"), etc también se contemplan en la presente invención. Tales formulaciones orales pueden estar en forma de tableta, cápsula, polvo, líquida o semi-sólida. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido, tal como gelatina o un adyuvante. Las formulaciones para administración rectal o vaginal pueden presentarse como un supositorio con un vehículo adecuado; véase también O'Hagan et al., Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9) (2003), 727-735. Más orientación con respecto a las formulaciones que son adecuadas para varios tipos de administración se pueden encontrar en Remington Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17a ed. (1985) y actualizaciones correspondiente. Para una revisión breve de los procedimientos para la administración de fármacos véase Langer, Science 249 (1990), 1527-1533.

25

Régimen de dosificación:

**[0176]** El régimen de dosificación será determinado por el médico responsable y factores clínicos. Como es muy conocido en la técnica médica, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área corporal superficial, el compuesto particular que se va a administrar, sexo, tiempo y ruta de administración, salud general, y otros fármacos que se administran simultáneamente. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 a 1.000 µg (o de ácido nucleico para la expresión o para la inhibición de la expresión en este intervalo); sin embargo, se consideran las dosis por debajo o por encima de este intervalo de ejemplo, especialmente considerando los factores mencionados anteriormente. Generalmente, el régimen como administración regular de la composición farmacéutica debe estar en el intervalo de 1 µg a 10 mg de unidades por día. Si el régimen es una infusión continua, también debe estar en el intervalo de 1 µg a 10 mg de unidades por kilogramo de peso corporal por minuto, respectivamente. El progreso puede monitorizarse mediante evaluación periódica. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo disolución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactato o aceites fijados. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y similares. Además, la composición farmacéutica de la invención puede comprender agentes adicionales, tales como agentes antitumorales y fármacos citotóxicos, dependiendo del uso previsto de la composición farmacéutica.

**[0177]** Además, la coadministración o la administración secuencial de otros agentes puede ser deseable. Una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a aquella cantidad de ingrediente activo suficiente para mejorar los síntomas o condiciones. La eficacia terapéutica y la toxicidad de tales compuestos pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y LD50 (la dosis letal para el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico, y puede expresarse como la relación LD50/ED50.

**[0178]** Preferiblemente, el agente terapéutico en la composición está presente en una cantidad suficiente para prevenir la inflamación o la supresión de la respuesta inmunitaria.

60

**[0179]** Estas y otras realizaciones se describen y abarcadas por la descripción y ejemplos de la presente invención. Además literatura referente a uno cualquiera de los materiales, procedimientos, usos y compuestos para emplear de acuerdo con la presente invención puede ser recuperada a partir de las bibliotecas públicas y bases de datos, utilizando por ejemplo dispositivos electrónicos. Por ejemplo, la base de datos pública "Medline" se puede utilizar, que está organizado por el Centro Nacional de Información de Biotecnología y/o la Biblioteca Nacional de Medicina de los Institutos Nacionales de Salud. Otras bases de datos y direcciones web, tales como las del Instituto

65

Europeo de Bioinformática (EBI), que es parte del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL) son conocidos por la persona experta en la técnica y también pueden obtenerse usando motores de búsqueda de Internet. Una visión general de la información de patentes en biotecnología y un estudio de las fuentes relevantes de información de patentes útiles para la búsqueda retrospectiva y para el conocimiento actual se da en Berks, TIBTECH 12 (1994), 5 352-364.

**[0180]** Varios documentos se citan en el texto de esta memoria. Las citas bibliográficas completas se pueden encontrar al final de la memoria descriptiva inmediatamente antes de las reivindicaciones.

10 **[0181]** Puede obtenerse una comprensión más completa por referencia a los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento para fines de ilustración.

## EJEMPLOS

15 **[0182]** Los ejemplos 1 a 6 que siguen y las correspondientes figuras 1 a 12 ilustran adicionalmente la invención mediante anticuerpos anti-IL-32 de ejemplo 2C2 y 19A1 de la presente invención y anticuerpos anti-IL-32 14B3 y 26A6 como anticuerpos de referencia. Las descripciones detalladas de procedimientos convencionales, tales como los empleados en el presente documento se pueden encontrar en la literatura citada; véase también "The Merck Manual of Diagnosis and Therapy" 17ª Ed. ed. por Beers y Berkow (Merck & Co., Inc., 2003).

20

**[0183]** La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante, e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica.

25 **[0184]** Los procedimientos de la genética molecular e ingeniería genética se describen generalmente en las ediciones actuales de Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Sambrook et al, (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press); DNA Cloning, Volúmenes I y II (Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (Gait ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (Hames y Higgins eds 1984.); Transcription and Translation (Hames y Higgins eds 1.984.); Culture of Animal Cells (Freshney y Alan, Liss, 30 Inc., 1987); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller y Calos, eds.); Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 3ª Edición (Ausubel et al, eds.); y Recombinant DNA Methodology (Wu, ed., Academic Press). Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller y Calos, eds, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory.); Methods in Enzymology, Volúmenes 154 y 155 (Wu et al., Eds.); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); *el tratado*, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc., Nueva York); Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Mayer y Walker, eds, Academic Press, Londres, 1987); Handbook of Experimental Immunology, volúmenes I-IV (Weir y Blackwell, eds., 1986). Los reactivos, vectores de clonación, y kits para manipulación genética referidos en esta descripción están disponibles de proveedores comerciales, tales como BioRad, Stratagene, Invitrogen y Clontech. Las técnicas generales de cultivo celular y recogida de los medios se describen en Large Scale Mammalian Cell Culture (Hu et al, Curr Opin Biotechnol 8 (1997), 148); Serum-free Media (Kitano, Biotechnology 17 (1991), 73); Large Scale Mammalian Cell Culture (Curr Opin Biotechnol 2 (1991), 375); y Suspension Culture of Mammalian Cells (Birch et al., Bioprocess Technol. 19 (1990), 251.

## Material y procedimientos

45

**[0185]** La selección de pacientes, el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de memoria de pacientes con APECED/APS, cultivo de células B y aislamiento de anticuerpos se llevaron a cabo tal como se describe en las solicitudes internacionales WO 2013/098419 A1 y WO 2013/098420 A1 con la diferencia de que la especificidad de los anticuerpos aislados y analizados se dirigió hacia isotipos de IL-32, tal como se define aquí anterior y posteriormente en lugar de IL-17 e IL-22, que se utilizaron específicamente en las solicitudes PCT mencionadas; ver secciones Ejemplos en las mismas, en particular, los Ejemplos 1 y 2 en las páginas 117 a 120 y en el Ejemplo 17 en las páginas 168-171 del documento WO 2013/098419 A1 y en los Ejemplos 1 a 4 en las páginas 27 a 31 del documento WO 2013/098420 A1.

55 **[0186]** La clonación molecular de los anticuerpos humanos de la presente invención y la posterior producción y purificación de anticuerpos se realizaron, tal como se describe en la solicitud internacional WO 2013/098419 A1, ver la sección de Ejemplos de la solicitud y en los Ejemplos particulares 1 a 3 en las páginas 117 -120 en la misma.

**[0187]** Se llevó a cabo un análisis de mutaciones del gen AIRE, tal como se describe en la solicitud internacional WO 2013/098419 A1; ver los Ejemplos en la misma, en particular la sección "Análisis de mutaciones del gen AIRE" en Materiales y Procedimientos de los Ejemplos, en las páginas 115-116, con etapas particulares realizadas, tal como se describe en el documento WO99/15559. En este aspecto, la genotipificación de las mutaciones respectivas en el gen AIRE (APECED) se realiza, tal como se describe en la solicitud internacional WO99/15559 en el Ejemplo 2 en las páginas 12 a 13; una confirmación de las mutaciones en los exones 2 y 6 del gen AIRE, tal como se describe en el Ejemplo 3 de la solicitud internacional WO99/15.559 en la página 13, línea 5 a página 14, línea 13 en su totalidad. En particular, para el análisis de mutaciones las muestras de ADN se purifican de células mononucleares

65

de sangre periférica de pacientes con APECED y de presuntos portadores de APECED y de controles sanos normales (de acuerdo con Sambrook et al. 1989, Molecular Cloning. A Laboratory Manual. CSH Press) y se someten a PCR utilizando cebadores específicos para todos los exones identificados.

**5 Ejemplo 1: Detección de anticuerpos específicos de citocinas humanas en el suero de los pacientes mediante ELISA**

**[0188]** La presencia general de diversos anticuerpos de citocinas y anticuerpos específicos de la enfermedad en los sueros de los pacientes que sufren de la condición genética APECED (poliendocrinopatía autoinmune-candidiasis-displasia epidérmica, también llamada poliendocrinopatía autoinmune de tipo 1 (APS1)) se ha obtenido mediante análisis Protoarray, tal como se describe en el Ejemplo 7 en la página 128 y en las Tablas 1 y 2 indicadas en las páginas 128 - 130 de la solicitud internacional del solicitante WO 2013/098419 A1. Además, se utilizó ELISA (ensayo inmunsorbente ligado a enzimas) para el análisis diferencial de IL-32gamma vs. análisis de alfa en el suero de los pacientes que sufren de la condición genética APECED (poliendocrinopatía autoinmune-candidiasis-displasia epidérmica, también llamada poliendocrinopatía autoinmune de tipo 1 (APS1)). En total, se utilizaron sueros de 30 pacientes, que se presentan por los códigos de APS1-1 a APS1-30, en los ensayos (ver Fig. 2).

ELISA - IL-32γ y IL-32α

**[0189]** Se recubrieron microplacas de 96 pocillos (Costar, EE.UU.) con IL-32γ (R & D) o IL-32α (ImmunoTools) humanas. Las placas se lavaron con PBS-T y se bloquearon 1 h a temperatura ambiente con PBS que contenía BSA al 2% (Sigma, Buchs, Suiza). Los sueros de pacientes, medio acondicionado con células B, o preparaciones de anticuerpos recombinantes se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. La unión de IgG humana al antígeno de interés se determinó usando un anticuerpo específico Fc-gamma anti-humano de cabra conjugado a peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch, Europe Ltd., Cambridgeshire, Reino Unido), seguido de medición de la actividad de HRP utilizando una solución de sustrato TMB (TMB, Sigma, Buchs, Suiza).

**Ejemplo 2: Determinación con ELISA de EC50 de los anticuerpos de la presente invención**

**[0190]** La unión a EC50 de anticuerpos anti-IL-32 de ejemplo de la presente invención a la IL-32γ (R & D) o IL-32α (ImmunoTools), se determinó mediante ELISA. Las diluciones en serie de MABs (de 100.000 ng/ml hacia abajo a 1,69 ng/ml) se incubaron durante 2 horas con placas recubiertas de antígeno (recubrimiento durante la noche a 1 μg/ml en PBS, seguido de lavado y bloqueo con BSA al 2% en PBS). Las placas se lavaron posteriormente y la unión de MABs se detectó con anticuerpo secundario específico de Fc-gamma conjugado a HRP anti-humano (Jackson ImmunoResearch, Europe Ltd., Cambridgeshire, Reino Unido). Las concentraciones de MAB que dan lugar a la mitad de la unión máxima a los antígenos respectivos (EC50, ng/ml) se calcularon usando el software Prism 4 GraphPad en las curvas sigmoidal de dosis-respuesta (pendiente variable, 4 parámetros) obtenidas representando el logaritmo de la concentración frente a mediciones de DO 450 nm; para los resultados véase la Fig. 3 y la Tabla 4 a continuación.

Tabla 3: Resumen de los valores de EC50 de la unión de MABs a IL-32gamma e IL-32alfa. MABs 14B3, 19A1, 26A6 no se unieron a IL-32alfa a la concentración más alta probada (100 ug/ml). MAB 2C2 se unió a IL-32alfa solamente a concentraciones muy altas, lo que indica que la unión a EC50 es mayor que 30 μg/ml

	EC50 (ng/ml)			
	<b>14B3</b>	<b>19A1</b>	<b>26A6</b>	<b>2C2</b>
IL-32 gamma	604	460	1332	526
IL-32 alfa	No se unieron	No se unieron	No se unieron	> 30.000

**Ejemplo 3: Ensayo de neutralización de IL-6**

**[0191]** Los ensayos de neutralización se llevaron a cabo en líneas celulares que responden a la citocina estudiado. La unión del ligando al receptor en general activa una vía de señalización correspondiente, la translocación de factores de transcripción al núcleo y regula por incremento la transcripción de genes respondedores, la traducción y, si es aplicable, la secreción de producto. La concentración de citocina utilizada se selecciona del inicio de la parte lineal de la curva dosis-respuesta para maximizar la sensibilidad del ensayo. Para ensayar la capacidad de neutralización de anticuerpos, la concentración óptima de la citocina diana se preincuba con diluciones en serie de suero, sobrenadante o muestras de anticuerpo purificado. Los resultados se expresan como título o concentración de anticuerpo que muestran el valor a medio camino entre los controles positivo y negativo. Aunque el receptor de la interleucina-32 aún no se ha descrito, se sabe que la interleucina-32 puede inducir otras citocinas inflamatorias, tales como IL-6, de monocitos/macrófagos in vitro e in vivo (Shoda et al., Arthritis Res Ther. 8 (2006); R166). En consecuencia, la IL-6 secretada puede ser y se usó como lectura de la actividad de IL-32 y se cuantificó con un kit de ELISA comercial (Biolegend) en el ensayo de neutralización de la presente invención.

**[0192]** Se acondicionaron macrófagos RAW 264.7 durante la noche en DMEM libre de suero. Se preincubó IL-32gamma (R & D, concentración final 50 ng/ml) con diluciones en serie de sobrenadante libre de suero de células HEK293T que expresan los anticuerpos monoclonales indicados en DMEM libre de suero durante 2 horas a 37 °C en los pocillos de placas de cultivo de 96 pocillos. Se añadieron células a 10.000 células por pocillo y se incubaron 5 18 horas a 37 °C en una incubadora de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se utilizó la secreción de IL-6 para controlar la actividad neutralizante de los anticuerpos anti-IL-32 de la presente invención; véase la Fig. 4B

#### **Ejemplo 4: Validación de los anticuerpos objeto**

##### 10 Ensayo de inflamación de la oreja

**[0193]** Se indujo el fenotipo de inflamación de la oreja en ratones de 8 semanas de edad C57BL/6J (WT; de Charles River) mediante inyección intradérmica de citocina humana IL-32 $\gamma$ , o IgG de control en 20  $\mu$ l de PBS (o PBS de control) en cada oreja proporcionada en días alternos en el día 1, día 4, día 6 y el día 8 (20  $\mu$ l/oreja, 125 ng/oreja, 15 250 ng/ratón/día) usando una aguja de calibre 30. El tratamiento con el anticuerpo anti-IL-32 2C2 de ejemplo de la presente invención se ensayó en estos animales con respecto a su potencial de neutralización para reducir el fenotipo inflamación de la oreja inducida. Sólo se administró una inyección IP de 2C2 o IgG de control humana [200  $\mu$ g, 100  $\mu$ g o 50  $\mu$ g/IP] a los animales en el día 0, antes de la inducción de la inflamación de la oreja. Los ratones se sacrificaron en el día 11.

20

**[0194]** Para probar un potencial efecto terapéutico de los anticuerpos de la presente invención, se realizaron mediciones del grosor de la oreja de los animales con un micrómetro digital Mitutoyo durante la administración de IL-32 mediante mediciones diarias antes de la inyección de IL-32.

25 **[0195]** Además, se ha controlado el peso corporal durante el tratamiento, sin embargo, no se han observado cambios de peso significativos en ninguno de los grupos de animales debido al tratamiento aplicado; véase la figura 7. Además, después del sacrificio de los animales, se realizaron tinciones para histología con H & E (hematoxilina y eosina; ver Harris, H.F., J. Appl Microscopy III (1900), 777-781 y Mallory, F.B.: Pathological technique. Philadelphia, Saunders, (1938)) de las orejas.

30

**[0196]** La combinación de dos experimentos independientes muestra que la inducción de la hinchazón de la oreja con la inyección intradérmica de IL-32 $\gamma$  humana se reduce en presencia de anticuerpo neutralizante 2C2; ver Figs. 5 y 6. Esto es significativo en el día 9 para las dosis de anticuerpos más bajas de 100  $\mu$ g, 50  $\mu$ g/IP respectivo; véase las figuras 5C, D y las figuras 6 C, D. Para la dosis más alta de 200  $\mu$ g/IP, la reducción significativa del hinchazón de la oreja puede incluso observarse a partir del día 5; véase la Fig. 5B y la Fig. 6B. El nivel de hinchazón de la oreja 35 después de la inyección intradérmica continua de control de PBS no se ve afectado por la presencia de IgG o 2C2; véase la Fig. 6A-D.

**[0197]** El anticuerpo anti-IL-32 2C2 de ejemplo demuestra efectos dependientes de la dosis y es capaz de 40 neutralizar la IL-32 $\gamma$  inyectada en un modelo de ratón. Además, tal como se muestra en las Figs. 9 y 10, el anticuerpo 19A1 neutraliza eficazmente la inflamación inducida por hIL-32 $\gamma$  en comparación con el anticuerpo 2C2 en el ensayo CytoEar. En consecuencia, los datos presentados en este documento indican que el anticuerpo anti-IL-32 de la presente invención es eficaz contra IL-32 $\gamma$  en experimentos de inflamación de la oreja inducida por citocinas, lo que demuestra el valor terapéutico de las moléculas de unión específica a IL-32 de la presente 45 invención.

##### Ensayo CytoAnkle:

**[0198]** A pesar de que no se ha identificado aún un homólogo de ratón de IL-32, hay indicios, como por ejemplo el 50 fenotipo de hinchazón de la oreja inducido, tal como se ha descrito anteriormente, que al menos algunos miembros de la vía IL-32 están presentes en los ratones también. Además, Joosten et al. (2006) han inyectado IL-32 humana en las articulaciones de la rodilla de ratones, que llevaron a la inducción de la hinchazón de las articulaciones, y se utilizó este tipo de experimentos como modelo para RA. Tales experimentos también se han realizado en relación con la presente invención, sin embargo, los animales han mostrado una hinchazón no medible después de 55 inyecciones de IL-32, lo que podría ser debido a la dificultad de medir el grosor de la rodilla a través del tejido muscular intermedio. Debido a este hecho, la presente invención estableció un nuevo ensayo para poner a prueba los efectos de la IL-32 en ratones y en particular de los anticuerpos anti-IL-32 de ejemplo de la presente invención, tal como se describe a continuación.

60 **[0199]** En este ensayo, cohortes de ratones (C57/BL6, 7-8 semanas) se inyectan por vía intraarticular (IA) con 62,5-250 ng de citocina, por ejemplo, un isotipo de IL-32, tal como IL32 $\gamma$  o IL-32 $\alpha$  o mezclas de varios isotipos de IL-32 en 10  $\mu$ l de PBS (o control de PBS) en los tobillos cada 48-72 horas. A continuación, se toman mediciones del grosor axial del tobillo con un micrómetro digital Mitutoyo. Los animales se pesan cada día y se administran los respectivos isotipo o isotipos de IL-32 mientras que los ratones se anestesian con isoflurano. El marco de tiempo 65 experimental está diseñado como se ha indicado anteriormente para el ensayo de inflamación de la oreja, con



inyecciones del anticuerpo o anticuerpos anti-IL-32 de la presente invención, con respecto a los grupos de control que se obtienen de PBS o IgG humanos de IL-32 de especificidad de unión no relacionada, tal como se indica anteriormente. La reducción de la hinchazón del tobillo se utiliza como una lectura del efecto terapéutico de los anticuerpos.

5

**[0200]** Además, el peso de los animales tratados con el anticuerpo anti-IL-32 y de los animales de control se controla durante el tratamiento, y después del sacrificio de los animales. Se realizan tinciones para histología con H & E (hematoxilina y eosina) de las orejas.

10 **[0201]** Fig. 11 muestra una configuración experimental de ejemplo del ensayo CytoAnkle (Fig. 11 A, B) y la dependencia de la dosis de IL-32 en la inducción de la inflamación en el ensayo de CytoAnkle (Fig. 11 C, D). Tal como se muestra adicionalmente en la figura 12, el efecto inflamatorio anti-IL-32 del anticuerpo 2C2 pudo confirmarse en el ensayo CytoAnkle (Fig. 12 CE).

15 **Ejemplo 5: Mapeo de epítomos de anticuerpos de IL-32 de ejemplo**

**[0202]** Como un primer paso del mapeo, se examina la unión diferencial de un MAB a-IL-32 para diferenciar los sitios de unión a antígeno para determinar el número de sitios de unión diferentes.

20 **[0203]** Para este fin, se utilizan dos enfoques. En el primer enfoque, se expresan los MAB con Fc humano (hMAB) o de ratón (hmMAB) y se llevan a cabo experimentos de competición cruzada mediante el recubrimiento de antígeno en placas y mediante la detección de la unión de hmMAB en presencia de un gran exceso de MABs humanos. La detección de hmMABs unidos al ligando se lleva a cabo por un anticuerpo secundario conjugado con HRP dirigido contra la porción Fc del anticuerpo primario.

25

**[0204]** Posteriormente, las regiones de unión de MABs a sus respectivos antígenos se intentan mapear usando análisis PepStar™. En este documento, se diseña la superposición de péptidos de 20 unidades (solapamiento de 15 aminoácidos) para cubrir los isotipos de IL-32 de interés, por ejemplo, IL-32γ, IL-32α, IL-32δ, IL32β y los isotipos restantes 5 y 6, incluyendo todas las variantes conocidas. Los péptidos y antígeno de longitud completa (como control positivo) manchan un microarray y se incuban el microarray de péptidos con el anticuerpo primario seguido por un anticuerpo secundario marcado de manera fluorescente dirigido contra la parte Fc del anticuerpo primario. Para evitar falsos negativos causados por impedimento estérico, se inserta un resto enlazador hidrofílico optimizado entre la superficie del vidrio y la secuencia de péptido derivada de antígeno.

35 **Ejemplo 6: Mediciones de afinidad de anticuerpos utilizando la tecnología SPR**

**[0205]** Para la determinación de la afinidad de los anticuerpos de la presente invención, se realizaron mediciones de resonancia de plasmón superficial SPR utilizando un instrumento ProteOn™ XPR36, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BIO-RAD; Hercules CA, EE.UU.), utilizando las moléculas de interés de la presente invención en una configuración experimental análoga a la descrito en el Ejemplo 14 de la solicitud internacional WO 2013/098419 A1 en las páginas 163-165. Mediante este procedimiento, la afinidad del anticuerpo de IL-32 de ejemplo de la presente invención, 2C2, se ha determinado mediante SPR que está en el rango nanomolar a aproximadamente 4 nM; véase la Fig. 8 y la tabla en la Fig. 8C.

45 **LISTADO DE SECUENCIAS**

**[0206]**

- 50 <110> ImmunoQure AG
- <120> Anticuerpos anti-IL-32 humanos
- <130> IM11A07/P-WO
- 55 <150> EP 13174937.6
- <151> 2013-07-03
- <160> 30
- 60 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 354
- <212> ADN
- 65 <213> Homo sapiens

ES 2 768 335 T3

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(354)  
 5 <223> secuencia de la cadena pesada variable (VH) 2C2-VH; 2C2: IgG3, Lambda

<220>  
 <221> V\_region  
 <222> (91)..(111)  
 10 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

<220>  
 <221> V\_region  
 <222> (154)..(201)  
 15 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

<220>  
 <221> V\_region  
 <222> (298)..(321)  
 20 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

<400> 1  
 cag ctg cgg gtg cag gag tcg ggc cca gga ctg ttg aag cct gcg gag 48  
 Gln Leu Arg Val Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Leu Lys Pro Ala Glu  
 25 1 5 10 15

acg ctg tcc ctc acc tgc agt gtc tct agt ggc tcc gtc agc aat agt 96  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Ser Gly Ser Val Ser Asn Ser  
 30 20 25 30

cgt tat tac tgg gcc tgg atc cgc cag tcc cca ggg aag gga ctg gag 144  
 Arg Tyr Tyr Trp Ala Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 35 40 45

tgg att ggg agt atg tat tat cgt ggg agg tcc tac tac aac ccg tcc 192  
 Trp Ile Gly Ser Met Tyr Tyr Arg Gly Arg Ser Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

ctc aag agt cgc ctc acc att tcg att gac acg tcc aag aat cag ttc 240  
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 40 65 70 75 80

tcc ctg aaa ctg acc tct ctg acc gcc gca gac acg gcc gtc tat tat 288  
 Ser Leu Lys Leu Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 45 85 90 95

tgt gcc gca gca gtt tat cac gac ctt gac tac tgg ggc cag gga acc 336  
 Cys Ala Ala Ala Val Tyr His Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 50 100 105 110

ctg gtc acc gtc tcc tca 354  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

55  
 <210> 2  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 60

<400> 2  
 Gln Leu Arg Val Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Leu Lys Pro Ala Glu  
 65 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Ser Gly Ser Val Ser Asn Ser  
 20 25 30

ES 2 768 335 T3

```

  Arg Tyr Tyr Trp Ala Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
  5      35      40      45
  Trp Ile Gly Ser Met Tyr Tyr Arg Gly Arg Ser Tyr Tyr Asn Pro Ser
  10     50     55     60
  Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
  15    65    70    75    80
  Ser Leu Lys Leu Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
  20    85    90
  Cys Ala Ala Ala Val Tyr His Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
  25   100  105  110
  Leu Val Thr Val Ser Ser
  30   115
  <210> 3
  <211> 333
  <212> ADN
  30 <213> Homo sapiens

  <220>
  <221> CDS
  35 <222> (1)..(333)
  <223> secuencia variable de cadena ligera (VL) 2C2-VL, tipo lambda

  <220>
  <221> V_region
  40 <222> (67)..(105)
  <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1

  <220>
  <221> V_region
  45 <222> (151)..(171)
  <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2

  <220>
  <221> V_region
  50 <222> (268)..(303)
  <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3

  <400> 3
  55 cag tct gtg ttg acg cag ccg ccc tca gtg tct gcg gcc cca gga cag      48
     Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
     1      5      10      15
  aag gtc acc atc tcc tgc tct gga agc ggc tcc agc att ggg aac aat      96
  60 Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Gly Ser Ser Ile Gly Asn Asn
     20      25      30
  tat gtc tcc tgg tac cag caa ctc cca gga gca gcc ccc aaa ctc ctc      144
  65 Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Ala Ala Pro Lys Leu Leu
     35      40      45
  att tat gac aat act aag cga ccc tca ggg att cct gac cga ttc tct      192
  Ile Tyr Asp Asn Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
     50      55      60

```

ES 2 768 335 T3

ggc tcc aag tct ggc acg tca gcc acc ctg gcc atc acc gga ctc caa 240  
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln 80  
 5  
 cct ggg gac gcg gcc gat tat tac tgc gga aca tgg gat agt agt ttc 288  
 Pro Gly Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Phe 95  
 10 agt gtt ttt tgg gta ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta 333  
 Ser Val Phe Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu 110  
 15 <210> 4  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 20 <400> 4  
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 25 Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Gly Ser Ser Ile Gly Asn Asn  
 20 25 30  
 30 Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Ala Ala Pro Lys Leu Leu  
 35 40 45  
 35 Ile Tyr Asp Asn Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 40 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln  
 65 70 75 80  
 Pro Gly Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Phe  
 85 90 95  
 45 Ser Val Phe Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105 110  
 50 <210> 5  
 <211> 1134  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 55  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1134)  
 <223> secuencia de cadena pesada constant (CH) 2C2-CH  
 60  
 <400> 5  
 gct tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gcg ccc tgc tcc agg 48  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg 15  
 1 5 10 15  
 65 agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac 96  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr 20 25 30

ES 2 768 335 T3

	ttc	ccc	gaa	ccg	gtg	acg	gtg	tcg	tgg	aac	tca	ggc	gcc	ctg	acc	agc	144
	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
			35					40					45				
5	ggc	gtg	cac	acc	ttc	ccg	gct	gtc	cta	cag	tcc	tca	gga	ctc	tac	tcc	192
	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
		50					55					60					
10	ctc	agc	agc	gtg	gtg	acc	gtg	ccc	tcc	agc	agc	ttg	ggc	acc	cag	acc	240
	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	
						70					75					80	
15	tac	acc	tgc	aac	gtg	aat	cac	aag	ccc	agc	aac	acc	aag	gtg	gac	aag	288
	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
					85					90					95		
20	aga	ggt	gag	ctc	aaa	acc	cca	ctt	ggt	gac	aca	act	cac	aca	tgc	cca	336
	Arg	Val	Glu	Leu	Lys	Thr	Pro	Leu	Gly	Asp	Thr	Thr	His	Thr	Cys	Pro	
				100					105					110			
25	cgg	tgc	cca	gag	ccc	aaa	tct	tgt	gac	aca	cct	ccc	ccg	tgc	cca	cgg	384
	Arg	Cys	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	
			115					120					125				
30	tgc	cca	gag	ccc	aaa	tct	tgt	gac	aca	cct	ccc	cca	tgc	cca	cgg	tgc	432
	Cys	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	
			130				135					140					
35	cca	gag	ccc	aaa	tct	tgt	gac	aca	cct	ccc	ccg	tgc	cca	agg	tgc	cca	480
	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	
			145			150					155					160	
40	gca	cct	gaa	ctc	ctg	gga	gga	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	528
	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	
					165					170					175		
45	ccc	aag	gat	acc	ctt	atg	att	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	acg	tgc	gtg	576
	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	
				180					185					190			
50	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	ccc	gag	gtc	cag	ttc	aag	tgg	tac	624
	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Lys	Trp	Tyr	
			195				200						205				
55	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ctg	cgg	gag	gag	672
	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Leu	Arg	Glu	Glu	
		210					215					220					
60	cag	tac	aac	agc	acg	ttc	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	720
	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	
						230					235					240	
65	cag	gac	tgg	ctg	aac	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	768
	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	
					245					250					255		
70	gcc	ctc	cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	acc	aaa	gga	cag	816
	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	
				260					265					270			
75	ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gag	gag	atg	864
	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	
			275					280					285				
80	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tac	ccc	912
	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	
		290					295					300					

ES 2 768 335 T3

```

    agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac      960
    Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
    305                               310                               315                               320
5   tac aac acc acg cct ccc atg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc      1008
    Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                               325                               330                               335
10  tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac atc      1056
    Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
                               340                               345                               350
15  ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cgc tac acg cag      1104
    Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln
                               355                               360                               365
20  aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga      1134
    Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                               370                               375

<210> 6
<211> 377
25 <212> PRT
    <213> Homo sapiens

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

```

ES 2 768 335 T3

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 165 170 175

5 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 180 185 190

10 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr  
 195 200 205

15 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Leu Arg Glu Glu  
 210 215 220

20 Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 245 250 255

25 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln  
 260 265 270

30 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
 275 280 285

35 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 290 295 300

40 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 325 330 335

45 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile  
 340 345 350

50 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln  
 355 360 365

55 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 370 375

<210> 7  
 <211> 321  
 60 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 65 <221> CDS  
 <222> (1)..(321)  
 <223> secuencia de cadena lambda constante (CL) 2C2-CL

ES 2 768 335 T3

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (271)..(321)
<223> no secuenciada pero obtenida de la base de datos
5
<400> 7
  agt cag ccc aag gct gcc ccc tcg gtc act ctg ttc ccg ccc tcc tct      48
  Ser Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
  1                               5                               10                               15
10
  gag gag ctt caa gcc aac aag gcc aca ctg gtg tgt ctc ata agt gac      96
  Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
                20                               25                               30
15
  ttc tac ccg gga gcc gtg aca gtg gcc tgg aag gca gat agc agc ccc      144
  Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
                35                               40                               45
20
  gtc aag gcg gga gtg gag acc acc aca ccc tcc aaa caa agc aac aac      192
  Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
                50                               55                               60
25
  aag tac gcg gcc agc agc tac ctg agc ctg acg cct gag cag tgg aag      240
  Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
  65                               70                               75                               80
30
  tcc cac aaa agc tac agc tgc cag gtc aca cat gaa ggg agc acc gtg      288
  Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
                85                               90                               95
30
  gag aag aca gtg gcc cct aca gaa tgt tca tag      321
  Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
                100                               105
35
<210> 8
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens
40
<400> 8
  Ser Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
  1                               5                               10                               15
45
  Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
                20                               25                               30
50
  Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
                35                               40                               45
55
  Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
  50                               55                               60
60
  Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
  65                               70                               75                               80
65
  Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
                85                               90                               95
65
  Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
                100                               105

```



ES 2 768 335 T3

```

<210> 9
<211> 348
5 <212> ADN
  <213> Homo sapiens

<220>
10 <221> CDS
   <222> (1)..(348)
   <223> secuencia de cadena pesada variable (VH) 14B3-VH; 14B3: IgG1, lambda

<220>
15 <221> V_region
   <222> (91)..(105)
   <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

<220>
20 <221> V_region
   <222> (148)..(198)
   <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

<220>
25 <221> V_region
   <222> (295)..(315)
   <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

<400> 9
30 cag gtc cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg      48
   Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
   1                               5                               10                               15

   tcc ctg aga ctc tcc tgt gta gcg tct gga ctc act ttc agg acc tat      96
   Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Leu Thr Phe Arg Thr Tyr
   20                               25                               30

   ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aac ggg ctg gag tgg gtg      144
   Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val
   35                               40                               45

   gca atc ata tgg cat gat ggt aat aaa aaa tac tat gca gac tcc gta      192
   Ala Ile Ile Trp His Asp Gly Asn Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
   50                               55                               60

   aag ggc cga ttc acc atc tcc agg gac aat tcc aag aac agt cta tat      240
   Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr
   65                               70                               75                               80

   ctc caa atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg gct gtg tat tac tgt      288
   Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
   85                               90                               95

   gcg aga gaa atg aat ggc atc gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc      336
   Ala Arg Glu Met Asn Gly Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
   100                              105                              110

   acc gtc tcc tca
   Thr Val Ser Ser      348
60                               115

<210> 10
<211> 116
65 <212> PRT
  <213> Homo sapiens

<400> 10

```

ES 2 768 335 T3

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

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

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

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

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

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

25 Ala Arg Glu Met Asn Gly Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
 100 105 110

30 Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 11  
 35 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

40 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(321)  
 <223> secuencia de cadena ligera variable (VL) 14B3-VL, tipo lambda

45 <220>  
 <221> V\_region  
 <222> (67)..(99)  
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1

50 <220>  
 <221> V\_region  
 <222> (145)..(165)  
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2

55 <220>  
 <221> V\_region  
 <222> (262)..(291)  
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3

60 <400> 11  
 tcc tat gag ctg acc cag cca ccc tcg gtg tca gtg tcc cca gga caa 48  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

65 acg gcc agg atc acc tgc tct gga gat gcg ttg cca gaa aca tat gtt 96  
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Glu Thr Tyr Val  
 20 25 30

ES 2 768 335 T3

tat tgg tac cag cag aag tca ggc cag gcc cct gtg aag ctc atc tat 144  
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Lys Leu Ile Tyr  
 35 40 45  
 5 gag gac agc gaa cga ccc tcc ggg atc cct gag aga ttc tct ggc tcc 192  
 Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 10 agc tca ggg aca ttg gcc acc ttg act atc agt ggg gcc cat gtg gag 240  
 Ser Ser Gly Thr Leu Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala His Val Glu  
 65 70 75 80  
 15 gat gaa gct gac tac tac tgt tac tca aca gac agt agt ggt atc ggg 288  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Ser Ser Gly Ile Gly  
 85 90 95  
 20 gtg ttc gga gga ggg acc aag ctg acc gtc cta 321  
 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105  
 <210> 12  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 25 <213> Homo sapiens  
 <400> 12  
 30 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Glu Thr Tyr Val  
 35 20 25 30  
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Lys Leu Ile Tyr  
 40 35 40 45  
 40 Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 45 Ser Ser Gly Thr Leu Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala His Val Glu  
 65 70 75 80  
 50 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Ser Ser Gly Ile Gly  
 85 90 95  
 55 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105  
 <210> 13  
 <211> 993  
 <212> ADN  
 60 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 65 <222> (1)..(993)  
 <223> secuencia de cadena pesada constante (CH) 14B3-CH  
 <400> 13

ES 2 768 335 T3

	gcc	tcc	acc	aag	ggc	cca	tcg	gtc	ttc	ccc	ctg	gca	ccc	tcc	tcc	aag	48
	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	
1					5				10					15			
5	agc	acc	tct	ggg	ggc	aca	gcg	gcc	ctg	ggc	tgc	ctg	gtc	aag	gac	tac	96
	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	
				20					25					30			
10	ttc	ccc	gaa	ccg	gtg	acg	gtg	tcg	tgg	aac	tca	ggc	gcc	ctg	acc	agc	144
	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
			35					40				45					
15	ggc	gtg	cac	acc	ttc	ccg	gct	gtc	cta	cag	tcc	tca	gga	ctc	tac	tcc	192
	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
		50					55				60						
20	ctc	agc	agc	gtg	gtg	acc	gtg	ccc	tcc	agc	agc	ttg	ggc	acc	cag	acc	240
	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	
						70					75					80	
	tac	atc	tgc	aac	gtg	aat	cac	aag	ccc	agc	aac	acc	aag	gtg	gac	aag	288
	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
					85				90						95		
25	aga	gtt	gag	ccc	aaa	tct	tgt	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccg	tgc	336
	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	
				100					105					110			
30	cca	gca	cct	gaa	ctc	ctg	ggg	gga	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	384
	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
			115					120					125				
35	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	432
	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
		130					135					140					
40	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	480
	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
						150				155						160	
	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	cgg	gag	528
	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
					165					170					175		
45	gag	cag	tac	aac	agc	acg	tac	cg	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	576
	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
				180					185					190			
50	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	624
	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
			195				200					205					
55	aaa	gcc	ctc	cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	672
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
		210					215					220					
60	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cg	gag	gag	720
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	
		225				230				235					240		
	atg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	768
	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
				245					250					255			
65	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	gag	aac	816
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
				260					265					270			

ES 2 768 335 T3

	aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc	864
	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Ser Asp Gly Ser Phe Phe	
	275 280 285	
5	ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac	912
	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn	
	290 295 300	
10	gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg	960
	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr	
	305 310 315 320	
15	cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa tga	993
	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
	325 330	
20	<210> 14	
	<211> 330	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 14	
25	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys	
	1 5 10 15	
30	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr	
	20 25 30	
35	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser	
	35 40 45	
40	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser	
	50 55 60	
40	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr	
	65 70 75 80	
45	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys	
	85 90 95	
50	Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys	
	100 105 110	
55	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro	
	115 120 125	
60	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	
	130 135 140	
60	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	
	145 150 155 160	
65	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	
	165 170 175	

ES 2 768 335 T3

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 5 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 10 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 15 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  
 20 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 25 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 30 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 35 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 40 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330  
 <210> 15  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 45  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(321)  
 50 <223> secuencia de cadena lambda constant (CL) 14B3-CL  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (271)..(321)  
 55 <223> no secuenciada pero obtenida de la base de datos  
 <400> 15  
 agt cag ccc aag gct gcc ccc tcg gtc act ctg ttc ccg ccc tcc tct 48  
 Ser Gln Pro Lys Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser  
 60 1 5 10  
 gag gag ctt caa gcc aac aag gcc aca ctg gtg tgt ctc ata agt gac 96  
 Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp  
 20 25 30  
 65 ttc tac ccg gga gcc gtg aca gtg gcc tgg aag gca gat agc agc ccc 144  
 Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro  
 35 40 45

ES 2 768 335 T3

5 gtc aag gcg gga gtg gag acc acc aca ccc tcc aaa caa agc aac aac 192  
 Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn  
 50 55 60  
 5 aag tac gcg gcc agc agc tac ctg agc ctg acg cct gag cag tgg aag 240  
 Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys  
 65 70 75 80  
 10 tcc cac aaa agc tac agc tgc cag gtc aca cat gaa ggg agc acc gtg 288  
 Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val  
 85 90 95  
 15 gag aag aca gtg gcc cct aca gaa tgt tca tag 321  
 Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 100 105

20 <210> 16  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25 <400> 16  
 Ser Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser  
 1 5 10 15

30 Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp  
 20 25 30

35 Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro  
 35 40 45

40 Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn  
 50 55 60

45 Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys  
 65 70 75 80

45 Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val  
 85 90 95

50 Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 100 105

55 <210> 17  
 <211> 348  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

60 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(348)  
 <223> secuencia de cadena pesada variable (VH) 19A1-VH; 19A1: IgG1, lambda

65 <220>  
 <221> V\_region  
 <222> (91)..(105)  
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

```

<220>
<221> V_region
<222> (148)..(198)
5 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

<220>
<221> V_region
<222> (295)..(315)
10 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

<400> 17
cag gtg cac ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg      48
Gln Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
15 1                    5                                10                15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gtc gcg tct gga ctc act ttc agg acc tat      96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Leu Thr Phe Arg Thr Tyr
20                    20                    25                    30

ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aac ggg ctg gag tgg gtg      144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val
35                    35                    40                    45

gca att ata tgg cat gat ggt aat aaa aaa tac tat gca gac tcc gta      192
Ala Ile Ile Trp His Asp Gly Asn Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50                    55                    60

aag ggc cga ttc acc atc tcc agg gac aat tcc aag aac agt cta tat      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr
30 65                    70                    75                    80

ctc caa atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg gct gtg tat tac tgt      288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35                    85                    90                    95

gcg aga gaa atg aat ggc atc gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc      336
Ala Arg Glu Met Asn Gly Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
40                    100                    105                    110

acc gtc tcc tca
Thr Val Ser Ser
45 115

<210> 18
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens
50

<400> 18
Gln Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
55 1                    5                                10                15

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

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val
60 35                    40                    45

Ala Ile Ile Trp His Asp Gly Asn Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
65 50                    55                    60

```



ES 2 768 335 T3

```

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

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

10 Ala Arg Glu Met Asn Gly Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
          100          105          110

Thr Val Ser Ser
          115

15
<210> 19
<211> 321
<212> ADN
20 <213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
25 <222> (1)..(321)
<223> secuencia de cadena ligera variable (VL) 19A1-VL, tipo lambda

<220>
<221> V_region
30 <222> (67)..(99)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1

<220>
<221> V_region
35 <222> (145)..(165)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2

<220>
<221> V_region
40 <222> (262)..(291)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3

<400> 19
45 tcc tat gag ctg acc cag cca ccc tcg gtg tca gtg tcc cca gga caa 48
   Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
   1          5          10          15

   acg gcc agg atc acc tgc tct gga gat gcg ttg cca gaa aca tat gtt 96
   Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Glu Thr Tyr Val
   50          20          25          30

   tat tgg tac cag cag aag tca ggc cag gcc cct gtg aag ctc atc tat 144
   Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Lys Leu Ile Tyr
   55          35          40          45

   gag gac agc gaa cga ccc tcc ggg atc cct gag aga ttc tct ggc tcc 192
   Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
   50          55          60

   agc tca ggg aca ttg gcc acc ttg act atc agt ggg gcc cat gtg gag 240
   Ser Ser Gly Thr Leu Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala His Val Glu
   60          65          70          75          80

   gat gaa gct gac tac tac tgt tac tca aca gac agt agt ggt atc ggg 288
   Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Ser Ser Gly Ile Gly
   65          70          75          80          85          90          95

gtg ttc gga gga ggg acc aag ctg acc gtc cta 321

```

ES 2 768 335 T3

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

5 <210> 20  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 20

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

15 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Glu Thr Tyr Val  
 20 25 30

20 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Lys Leu Ile Tyr  
 35 40 45

25 Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Ser Ser Gly Thr Leu Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala His Val Glu  
 65 70 75 80

30 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Ser Ser Gly Ile Gly  
 85 90 95

35 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

40 <210> 21  
 <211> 993  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

45 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(993)  
 <223> secuencia de cadena pesada constante (CH) 19A1-CH

50 <400> 21

gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag 48  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15

55 agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac 96  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

60 ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc 144  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

65 ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc 192  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc 240

ES 2 768 335 T3

	Leu 65	Ser	Ser	Val	Val	Thr 70	Val	Pro	Ser	Ser	Ser 75	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr 80	
5	tac Tyr	atc Ile	tgc Cys	aac Asn	gtg Val 85	aat Asn	cac His	aag Lys	ccc Pro	agc Ser 90	aac Asn	acc Thr	aag Lys	gtg Val	gac Asp 95	aag Lys	288
10	aga Arg	gtt Val	gag Glu	ccc Pro 100	aaa Lys	tct Ser	tgt Cys	gac Asp	aaa Lys 105	act Thr	cac His	aca Thr	tgc Cys	cca Pro 110	ccg Pro	tgc Cys	336
15	cca Pro	gca Ala	cct Pro 115	gaa Glu	ctc Leu	ctg Leu	ggg Gly	gga Gly 120	ccg Pro	tca Ser	gtc Val	ttc Phe	ctc Leu 125	ttc Phe	ccc Pro	cca Pro	384
	aaa Lys	ccc Pro 130	aag Lys	gac Asp	acc Thr	ctc Leu	atg Met 135	atc Ile	tcc Ser	cgg Arg	acc Thr	cct Pro 140	gag Glu	gtc Val	aca Thr	tgc Cys	432
20	gtg Val 145	gtg Val	gtg Val	gac Asp	gtg Val	agc Ser 150	cac His	gaa Glu	gac Asp	cct Pro	gag Glu 155	gtc Val	aag Lys	ttc Phe	aac Asn	tgg Trp 160	480
25	tac Tyr	gtg Val	gac Asp	ggc Gly	gtg Val 165	gag Glu	gtg Val	cat His	aat Asn	gcc Ala 170	aag Lys	aca Thr	aag Lys	ccg Pro	cgg Arg 175	gag Glu	528
30	gag Glu	cag Gln	tac Tyr	aac Asn 180	agc Ser	acg Thr	tac Tyr	cgt Arg	gtg Val 185	gtc Val	agc Ser	gtc Val	ctc Leu	acc Thr 190	gtc Val	ctg Leu	576
35	cac His	cag Gln	gac Asp 195	tgg Trp	ctg Leu	aat Asn	ggc Gly	aag Lys 200	gag Glu	tac Tyr	aag Lys	tgc Cys	aag Lys 205	gtc Val	tcc Ser	aac Asn	624
40	aaa Lys	gcc Ala 210	ctc Leu	cca Pro	gcc Ala	ccc Pro	atc Ile 215	gag Glu	aaa Lys	acc Thr	atc Ile	tcc Ser 220	aaa Lys	gcc Ala	aaa Lys	ggg Gly	672
45	cag Gln 225	ccc Pro	cga Arg	gaa Glu	cca Pro	cag Gln 230	gtg Val	tac Tyr	acc Thr	ctg Leu	ccc Pro 235	cca Pro	tcc Ser	cgg Arg	gag Glu	gag Glu 240	720
50	atg Met	acc Thr	aag Lys	aac Asn	cag Gln 245	gtc Val	agc Ser	ctg Leu	acc Thr	tgc Cys 250	ctg Leu	gtc Val	aaa Lys	ggc Gly	ttc Phe 255	tat Tyr	768
55	ccc Pro	agc Ser	gac Asp	atc Ile 260	gcc Ala	gtg Val	gag Glu	tgg Trp	gag Glu 265	agc Ser	aat Asn	ggg Gly	cag Gln	ccg Pro 270	gag Glu	aac Asn	816
60	aac Asn	tac Tyr	aag Lys 275	acc Thr	acg Thr	cct Pro	ccc Pro	gtg Val 280	ctg Leu	gac Asp	tcc Ser	gac Asp	ggc Gly 285	tcc Ser	ttc Phe	ttc Phe	864
65	ctc Leu	tat Tyr 290	agc Ser	aag Lys	ctc Leu	acc Thr	gtg Val 295	gac Asp	aag Lys	agc Ser	agg Arg	tgg Trp 300	cag Gln	cag Gln	ggg Gly	aac Asn	912
70	gtc Val 305	ttc Phe	tca Ser	tgc Cys	tcc Ser	gtg Val 310	atg Met	cat His	gag Glu	gct Ala	ctg Leu 315	cac His	aac Asn	cac His	tac Tyr	acg Thr 320	960
75	cag Gln	aag Lys	agc Ser	ctc Leu	tcc Ser 325	ctg Leu	tcc Ser	ccg Pro	ggt Gly	aaa Lys 330	tga						993

ES 2 768 335 T3

<210> 22  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5 <400> 22

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  
 Arg 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

ES 2 768 335 T3

	245		250		255														
5	Pro	Ser	Asp	Ile 260	Ala	Val	Glu	Trp	Glu 265	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro 270	Glu	Asn			
10	Asn	Tyr	Lys 275	Thr	Thr	Pro	Pro	Val 280	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly 285	Ser	Phe	Phe			
15	Leu	Tyr 290	Ser	Lys	Leu	Thr	Val 295	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp 300	Gln	Gln	Gly	Asn			
20	Val 305	Phe	Ser	Cys	Ser	Val 310	Met	His	Glu	Ala	Leu 315	His	Asn	His	Tyr	Thr 320			
25	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser 325	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys 330									
30	<210>	23																	
35	<211>	321																	
40	<212>	ADN																	
45	<213>	Homo sapiens																	
50	<220>																		
55	<221>	CDS																	
60	<222>	(1)..(321)																	
65	<223>	secuencia de cadena lambda constante (CL) 19A1-CL																	
70	<220>																		
75	<221>	misc_feature																	
80	<222>	(271)..(321)																	
85	<223>	no secuenciada pero obtenida de la base de datos																	
90	<400>	23																	
95	agt	cag	ccc	aag	gct	gcc	ccc	tcg	gtc	act	ctg	ttc	ccg	ccc	tcc	tct			48
100	Ser	Gln	Pro	Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser			
105	1				5					10					15				
110	gag	gag	ctt	caa	gcc	aac	aag	gcc	aca	ctg	gtg	tgt	ctc	ata	agt	gac			96
115	Glu	Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp			
120				20					25					30					
125	ttc	tac	ccg	gga	gcc	gtg	aca	gtg	gcc	tgg	aag	gca	gat	agc	agc	ccc			144
130	Phe	Tyr	Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Ser	Ser	Pro			
135			35					40					45						
140	gtc	aag	gcg	gga	gtg	gag	acc	acc	aca	ccc	tcc	aaa	caa	agc	aac	aac			192
145	Val	Lys	Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn			
150		50				55						60							
155	aag	tac	gcg	gcc	agc	agc	tac	ctg	agc	ctg	acg	cct	gag	cag	tgg	aag			240
160	Lys	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys			
165	65				70				75						80				
170	tcc	cac	aaa	agc	tac	agc	tgc	cag	gtc	aca	cat	gaa	ggg	agc	acc	gtg			288
175	Ser	His	Lys	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val			
180				85					90						95				
185	gag	aag	aca	gtg	gcc	cct	aca	gaa	tgt	tca	tag								321
190	Glu	Lys	Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser									
195				100					105										

ES 2 768 335 T3

```

<210> 24
<211> 106
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens

<400> 24
1 Ser Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
5
15 Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
20
35 Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
40
50 Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
55
65 Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
70
90 Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
95
100 Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
105

<210> 25
<211> 348
<212> ADN
40 <213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
45 <222> (1)..(348)
<223> secuencia de cadena pesada variable (VH) 26A6-VH; 26A6: IgG1, lambda

<220>
<221> V_region
50 <222> (91)..(105)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

<220>
<221> V_region
55 <222> (148)..(198)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

<220>
<221> V_region
60 <222> (295)..(315)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

<400> 25
65 cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48
1 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gta gcg tct gga ctc act ttc agg acc tat 96

```

ES 2 768 335 T3

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

5 ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aac ggg ctg gag tgg gtg 144  
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

10 gca atc ata tgg cat gat ggt aat aaa aaa tac ttt gct gac tcc gta 192  
Ala Ile Ile Trp His Asp Gly Asn Lys Lys Tyr Phe Ala Asp Ser Val  
50 55 60

15 aag ggc cga ttc acc atc tcc agg gac aat tcc aag aac agt cta tat 240  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

ctc caa atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg gct gtt tat tac tgt 288  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

20 gcg aga gaa atg aat ggc atc gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc 336  
Ala Arg Glu Met Asn Gly Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
100 105 110

25 acc gtc tcc tca 348  
Thr Val Ser Ser  
115

<210> 26  
30 <211> 116  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 26  
35 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

60 Ala Arg Glu Met Asn Gly Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
100 105 110

65 Thr Val Ser Ser  
115

<210> 27

ES 2 768 335 T3

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

5  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(321)  
 <223> secuencia de cadena ligera variable (VL) 26A6-VL, tipo lambda

10  
 <220>  
 <221> V\_region  
 <222> (67)..(99)  
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1

15  
 <220>  
 <221> V\_region  
 <222> (145)..(165)  
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2

20  
 <220>  
 <221> V\_region  
 <222> (262)..(291)  
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3

25  
 <400> 27  
 tcc tat gag ctg acc cag cca ccc tcg gtg tca gtg tcc cca gga caa 48  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

30  
 acg gcc agg atc acc tgc tct gga gat gcg ttg cca gaa aca tat gtt 96  
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Glu Thr Tyr Val  
 20 25 30

35  
 tat tgg tac cag cag aag tca ggc cag gcc cct gtg aag ctc atc tat 144  
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Lys Leu Ile Tyr  
 35 40 45

40  
 gag gac agc gaa cga ccc tcc ggg atc cct gag aga ttc tct ggc tcc 192  
 Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

45  
 agc tca ggg aca ttg gcc acc ttg act atc agt ggg gcc cat gtg gag 240  
 Ser Ser Gly Thr Leu Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala His Val Glu  
 65 70 75 80

50  
 gat gaa gct gac tac tac tgt tac tca aca gac agt agt ggt atc ggg 288  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Ser Ser Gly Ile Gly  
 85 90 95

55  
 gtg ttc gga gga ggg acc aag gtg acc gtc cta 321  
 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
 100 105

55  
 <210> 28  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

60  
 <400> 28  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 65  
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Glu Thr Tyr Val  
 20 25 30



ES 2 768 335 T3

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Lys Leu Ile Tyr  
 5 35 40 45  
 Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 10 50 55 60  
 Ser Ser Gly Thr Leu Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala His Val Glu  
 15 65 70 75 80  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Ser Ser Gly Ile Gly  
 20 85 90 95  
 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
 100 105  
 <210> 29  
 <211> 321  
 25 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 30 <221> CDS  
 <222> (1)..(321)  
 <223> secuencia de cadena lambda constante (CL) 26A6-CL  
 <220>  
 35 <221> misc\_feature  
 <222> (271)..(321)  
 <223> no secuenciada pero obtenida de la base de datos  
 <400> 29  
 40 agt cag ccc aag gct gcc ccc tcg gtc act ctg ttc ccg ccc tcc tct 48  
 Ser Gln Pro Lys Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser  
 1 5 10 15  
 gag gag ctt caa gcc aac aag gcc aca ctg gtg tgt ctc ata agt gac 96  
 45 Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp  
 20 25 30  
 ttc tac ccg gga gcc gtg aca gtg gcc tgg aag gca gat agc agc ccc 144  
 50 Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro  
 35 40 45  
 gtc aag gcg gga gtg gag acc acc aca ccc tcc aaa caa agc aac aac 192  
 Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn  
 50 55 60  
 aag tac gcg gcc agc agc tac ctg agc ctg acg cct gag cag tgg aag 240  
 65 Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys  
 70 75 80  
 tcc cac aaa agc tac agc tgc cag gtc aca cat gaa ggg agc acc gtg 288  
 60 Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val  
 85 90 95  
 gag aag aca gtg gcc cct aca gaa tgt tca tag 321  
 65 Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 100 105

ES 2 768 335 T3

<210> 30  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5 <400> 30

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

## REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo anti-interleucina-32 (IL-32) monoclonal humano o un fragmento de unión a IL-32 del mismo que comprende en su cadena pesada (VH) y cadena ligera variable (VL) las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3 y VL-CDR1, VL-CDR2 y VL-CDR3 seleccionadas de
- 5 (a)  
 VH-CDR1: posiciones 31-37 de la SEQ ID NO: 2  
 VH-CDR2: posiciones 52-67 de la SEQ ID NO: 2  
 VH-CDR3: posiciones 100-107 de la SEQ ID NO: 2  
 10 VL-CDR1: posiciones 23-35 de la SEQ ID NO: 4  
 VL-CDR2: posiciones 51-57 de la SEQ ID NO: 4  
 VL-CDR3: posiciones 90-101 de la SEQ ID NO: 4; y
- (b)  
 VH-CDR1: posiciones 31-35 de la SEQ ID NO: 18  
 15 VH-CDR2: posiciones 50-66 de la SEQ ID NO: 18  
 VH-CDR3: posiciones 99-105 de la SEQ ID NO: 18  
 VL-CDR1: posiciones 23-33 de la SEQ ID NO: 20  
 VL-CDR2: posiciones 49-55 de la SEQ ID NO: 20  
 VL-CDR3: posiciones 88-97 de la SEQ ID NO: 20,
- 20 en el que el anticuerpo o fragmento de unión a IL-32 es capaz de  
 (i) unirse a IL-32 gamma (IL-32 $\gamma$ ) recombinante humana; y  
 (ii) neutralizar una actividad biológica de IL-32 $\gamma$ , en el que la actividad biológica es la inflamación inducida por IL-32 $\gamma$  humana que se determina en un ensayo de inflamación de la oreja.
- 25 2. Anticuerpo o fragmento de unión a IL-32, según la reivindicación 1, que comprende en su región variable una secuencia de aminoácidos de la región V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> establecida en las SEQ ID NO: 2 y 4, respectivamente, o SEQ ID NO: 18 y 20, respectivamente, o una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 90%.
3. Anticuerpo, según la reivindicación 1 o 2, que es IgG1 o IgG3.
- 30 4. Anticuerpo o fragmento de unión a IL-32, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una región constante C<sub>H</sub> y/o C<sub>L</sub> que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las secuencias de aminoácidos de C<sub>H</sub> y C<sub>L</sub> establecidas en las SEQ ID NOs.: 6, 8, 14, 16, 22, 24 y 30 o una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 60%.
- 35 5. Anticuerpo o fragmento de unión a IL-32 del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que se selecciona del grupo que consiste en un fragmento F<sub>v</sub> de cadena sencilla (scFv), un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab) y un fragmento F(ab)<sub>2</sub>.
- 40 6. Uno o más polinucleótidos que codifican al menos las regiones variables del anticuerpo o fragmento de unión a IL-32 del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Uno o más vectores que comprenden el polinucleótido o polinucleótidos, según la reivindicación 6.
- 45 8. Célula huésped que comprende el polinucleótido o polinucleótidos, según la reivindicación 6, o el vector o vectores, según la reivindicación 7, preferiblemente en el que el polinucleótido es un ADNc que codifica las regiones variables y al menos parte del dominio constante.
9. Procedimiento para preparar un anticuerpo anti-IL-32 o fragmento de unión a IL-32 del mismo, comprendiendo dicho procedimiento
- 50 (a) cultivar la célula según la reivindicación 8; y  
 (b) aislar el anticuerpo o cadena o cadenas de inmunoglobulina del mismo a partir del cultivo.
10. Anticuerpo o fragmento de unión a IL-32 del mismo codificado por un polinucleótido, según la reivindicación 6, u
- 55 obtenible mediante el procedimiento según la reivindicación 9.
11. Anticuerpo anti-IL-32 o fragmento de unión a IL-32, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 10, que está  
 (i) marcado de manera detectable, preferiblemente en el que el marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en una enzima, un radioisótopo, un fluoróforo, un péptido y un metal pesado; o
- 60 (ii) unido a un fármaco.
12. Composición o kit que comprende el anticuerpo anti-IL-32 o fragmento de unión a IL-32, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 10 u 11, el polinucleótido o polinucleótidos, según la reivindicación 6, el vector o vectores, según la reivindicación 7, o la célula, según la reivindicación 8, preferiblemente en la que la composición es
- 65 (i) una composición farmacéutica y comprende adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable y que comprende además opcionalmente un agente adicional útil para tratar una enfermedad inflamatoria; o

(ii) una composición de diagnóstico y comprende adicionalmente reactivos utilizados convencionalmente en procedimientos de diagnóstico de base inmunológica o basados en ácidos nucleicos.

13. Anticuerpo anti-IL-32 o fragmento de unión a IL-32, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 10 u 11, o  
5 composición, según la reivindicación 12, para utilizar en un procedimiento de:
- (a) tratar o prevenir la progresión de una enfermedad o afección mediada por el sistema inmunitario o autoinmune;
  - (b) mejora de los síntomas asociados con una enfermedad o afección mediada por el sistema inmunitario o autoinmune; y/o
  - (c) diagnosticar o cribar un sujeto por la presencia o para determinar el riesgo de un sujeto de desarrollar una
- 10 enfermedad o afección mediada por el sistema inmunitario o autoinmune  
en el que el trastorno se asocia con la expresión de IL-32 en un paciente, preferiblemente, en el que dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), incluyendo enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enfermedad celíaca, psoriasis, artritis reumatoide (RA), espondilitis anquilosante y otras formas de espondiloartritis, artritis psoriásica, miastenia gravis, enfermedad pulmonar
- 15 obstructiva crónica (EPOC), asma, tuberculosis, cáncer, incluyendo leucemia, inflamación vascular y aterosclerosis.
14. Procedimiento in vitro para el diagnóstico de una enfermedad o afección mediada por el sistema inmunitario o autoinmune en un sujeto asociado con la expresión de IL-32 que comprende poner en contacto una muestra biológica de la célula del sujeto con un anticuerpo anti-IL-32 o fragmento de unión a IL-32, según cualquiera de las
- 20 reivindicaciones 1 a 5, 10 u 11, y detectar la presencia de IL-32, en el que preferiblemente IL-32 es IL-32 $\gamma$ .
15. Procedimiento para detectar o determinar IL-32 en una muestra biológica aislada que comprende mezclar la muestra con un anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 10 o 11, permitir que el anticuerpo forme un complejo con cualquier IL-32 presente en la mezcla, y detectar dicho complejo presente en la mezcla, en el que
- 25 preferiblemente IL-32 es IL-32 $\gamma$ .

**A 2C2 (IgG3, secuencia de cadena pesada variable VH) – SEQ ID NO: 2**  
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----  
 QLRVQESGPGLLKPAETLSLTCSVSSGSVSNSRYIWAWIRQSPGKGLEWIGSMYYRGRSYYNPSLKS

FR3-----CDR3-----FR4-----  
 RLTISIDTSKNQFSLKLTSLTAADTAVYYCAAAVYHDLDYWGQGLVTVSS

**2C2 (secuencia de cadena lambda variable VL) – SEQ ID NO: 4**  
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----  
 QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSGSSIGNNYVSWYQQLPGAAPKLLIYDNTKRPS

FR3-----CDR3-----FR4-----  
 GIPDRFSGSKSGTSATLAI TGLQPGDAADYYCGTWDSFSVFWVFGGGTKLTVL

**B 14B3 (IgG1, secuencia de cadena pesada variable VH) – SEQ ID NO: 10**  
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----  
 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGLTFRTYGMHWVRQAPNGLEWVAI IWHDGNKKKYADSVKG

FR3-----CDR3-----FR4-----  
 RFTISRDNKNSLYLQMNSLRVEDTAVYYCAREMNGIDVWGQGTTVTVSS

**14B3 (secuencia de cadena lambda variable VL) – SEQ ID NO: 12**  
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----  
 SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPETYVYWYQQKSGQAPVKLIYEDSERPS

FR3-----CDR3-----FR4-----  
 GIPERFSGSSSGTLATLTISGAHVEDEADYYCYSTDSSGIGVFGGGTKLTVL

**C 19A1 (IgG1, secuencia de cadena pesada variable VH) – SEQ ID NO: 18**  
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----  
 QVHLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGLTFRTYGMHWVRQAPNGLEWVAI IWHDGNKKKYADSVKG

FR3-----CDR3-----FR4-----  
 RFTISRDNKNSLYLQMNSLRVEDTAVYYCAREMNGIDVWGQGTTVTVSS

**19A1 (secuencia de cadena lambda variable VL) – SEQ ID NO: 20**  
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----  
 SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPETYVYWYQQKSGQAPVKLIYEDSERPS

FR3-----CDR3-----FR4-----  
 GIPERFSGSSSGTLATLTISGAHVEDEADYYCYSTDSSGIGVFGGGTKLTVL

Fig. 1

**D 26A6 (IgG1, secuencia de cadena pesada variable VH) – SEQ ID NO: 26**

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----  
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGLTFRTYGMHWVRQAPGNLEWVAIIWHDGNKKYFADSVKG

FR3-----CDR3---FR4-----  
RFTISRDNKNSLYLQMNSLRVEDTAVYYCAREMNGIDVWGQGTTVTVSS

**26A6 (secuencia de cadena lambda variable VL) – SEQ ID NO: 28**

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---  
SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPETYVYWYQQKSGQAPVKLIYEDSERPS

FR3-----CDR3-----FR4-----  
GIPERFSGSSSGTLATLTI SGAHVEDEADYYCYSTDSSGIGVFGGGTKVTVL

**Fig. 1 (continuación)**

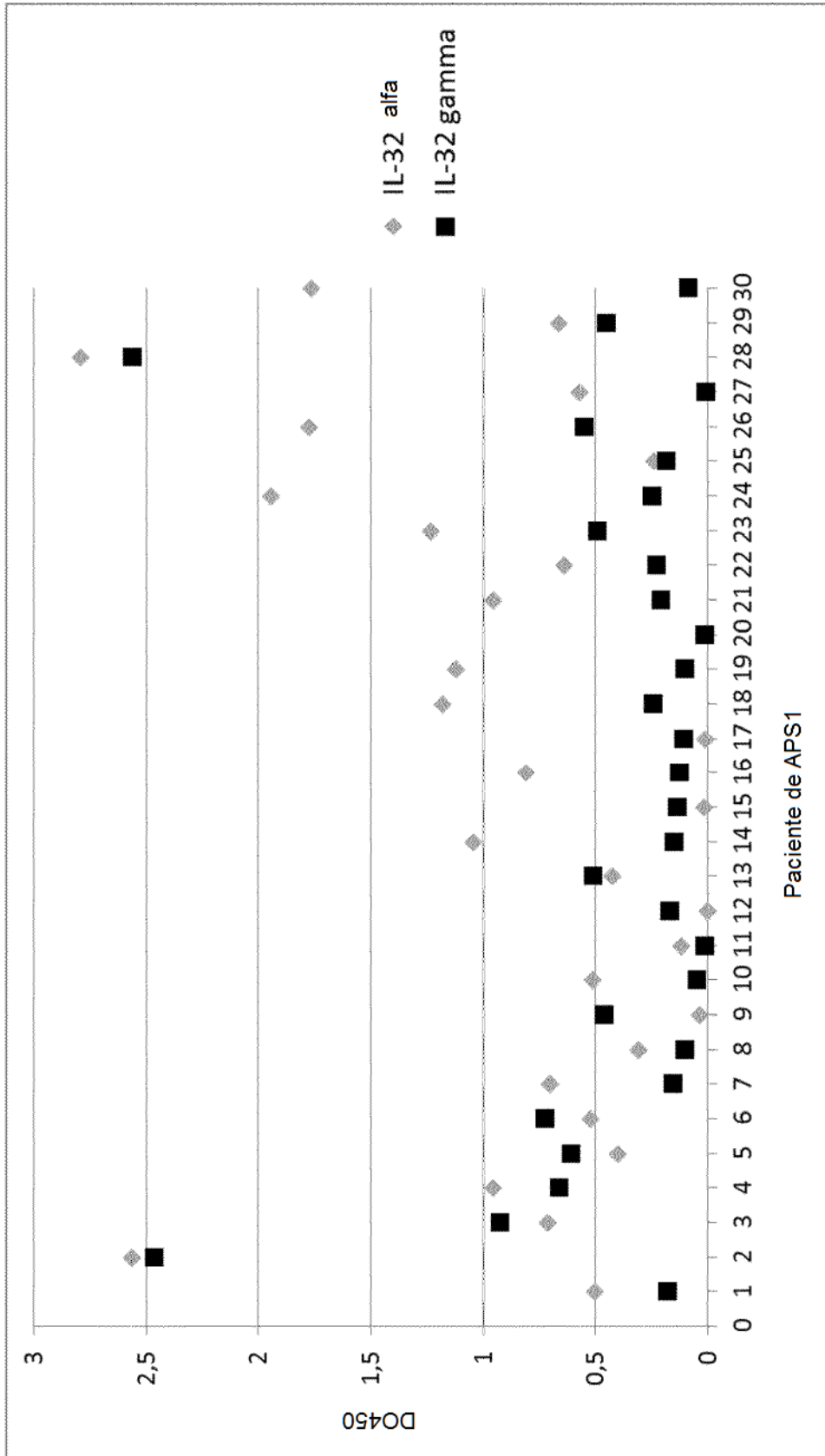


Fig. 2

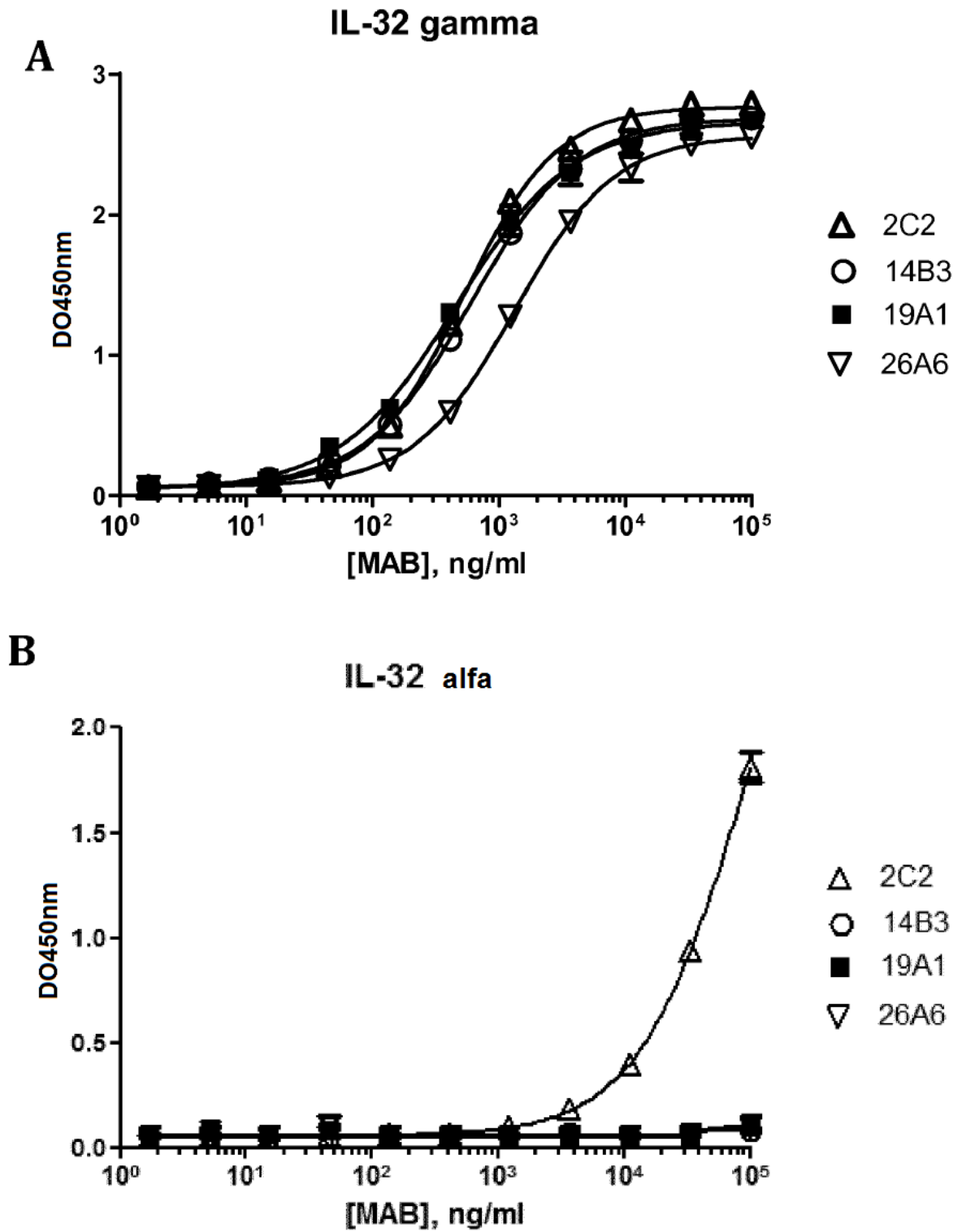


Fig. 3



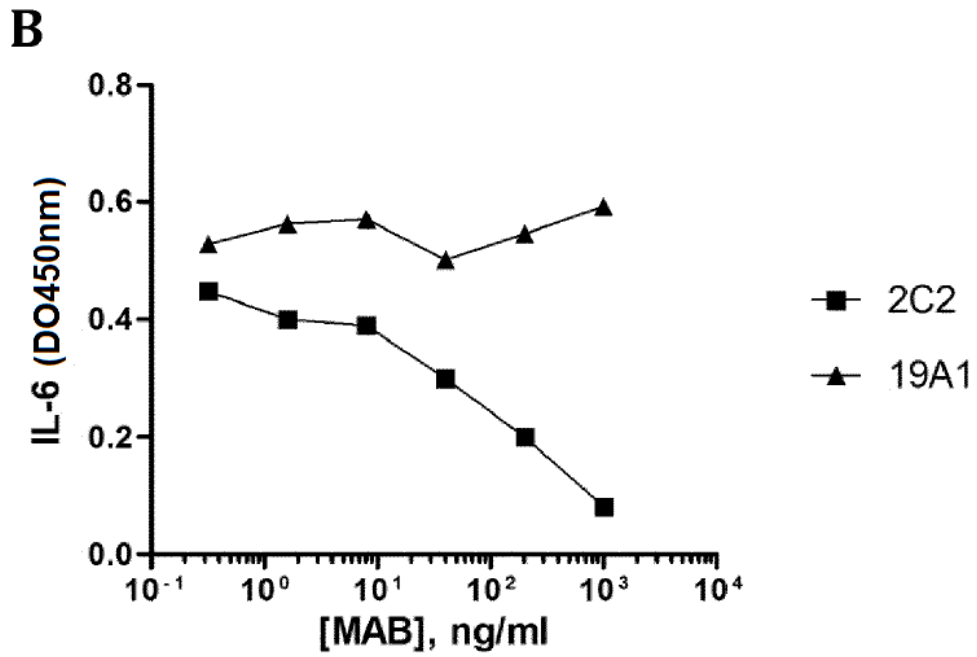
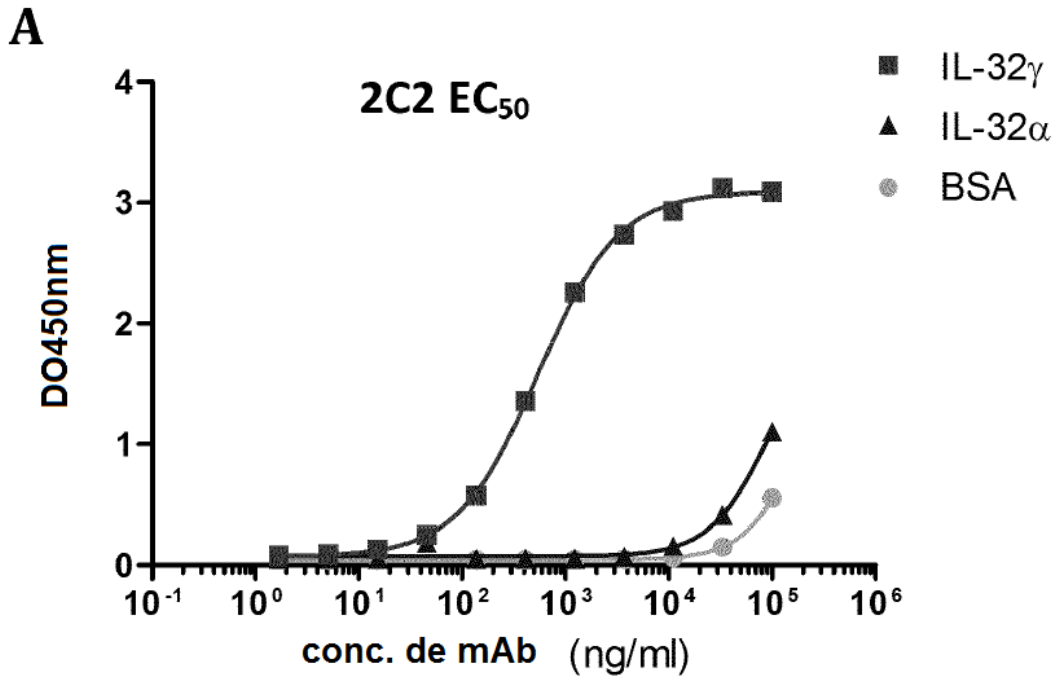


Fig. 4

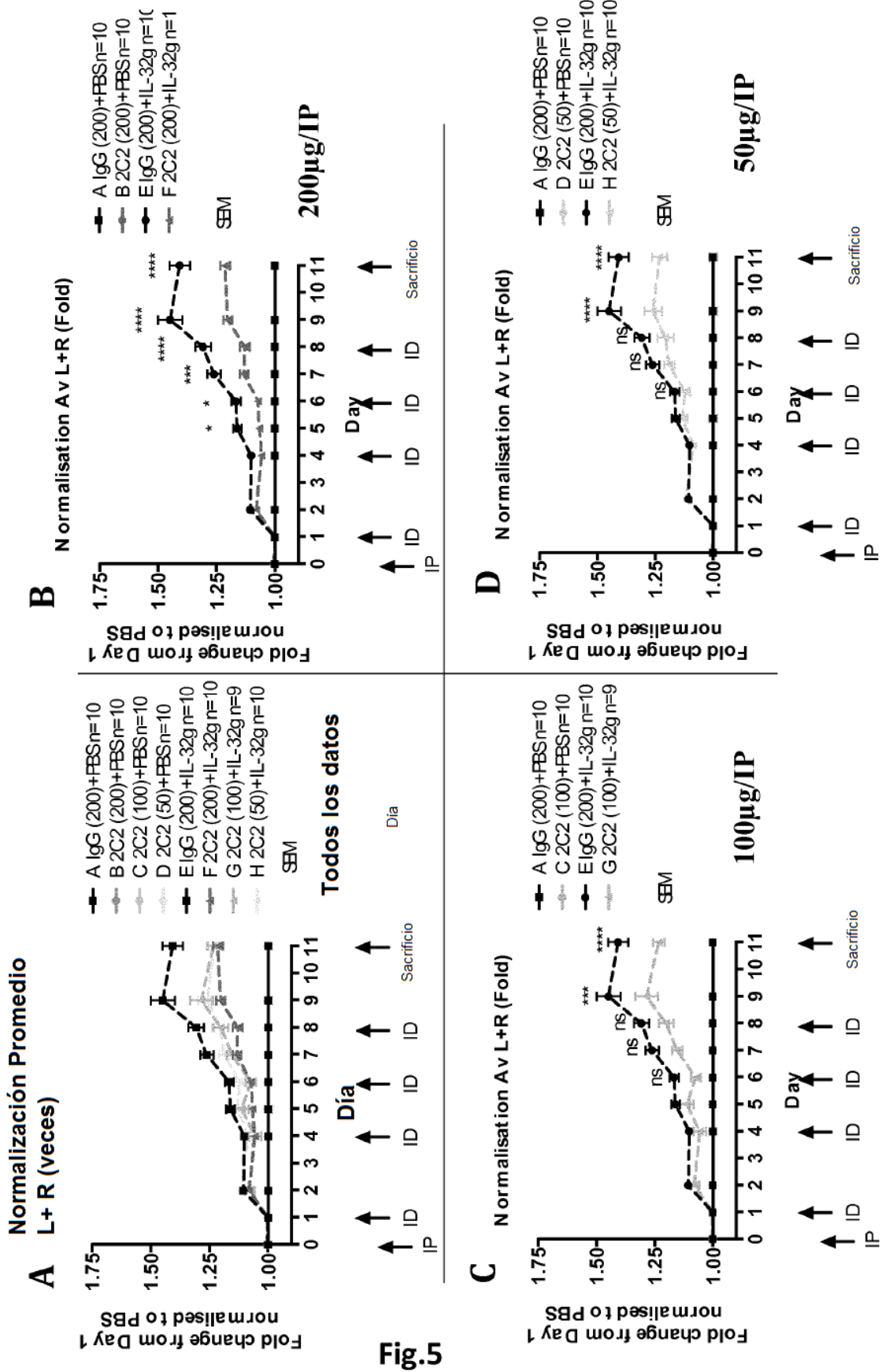


Fig.5

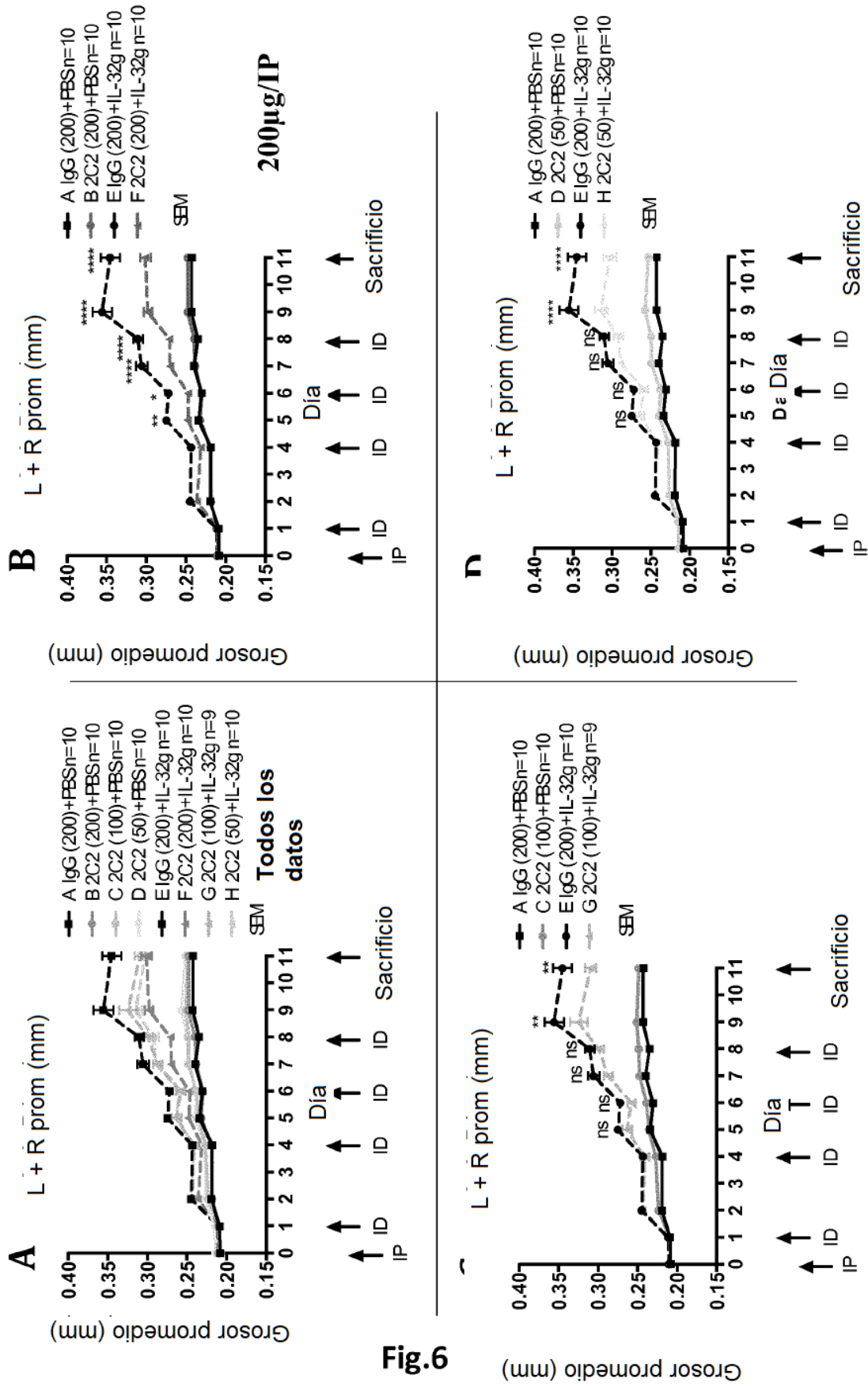


Fig.6

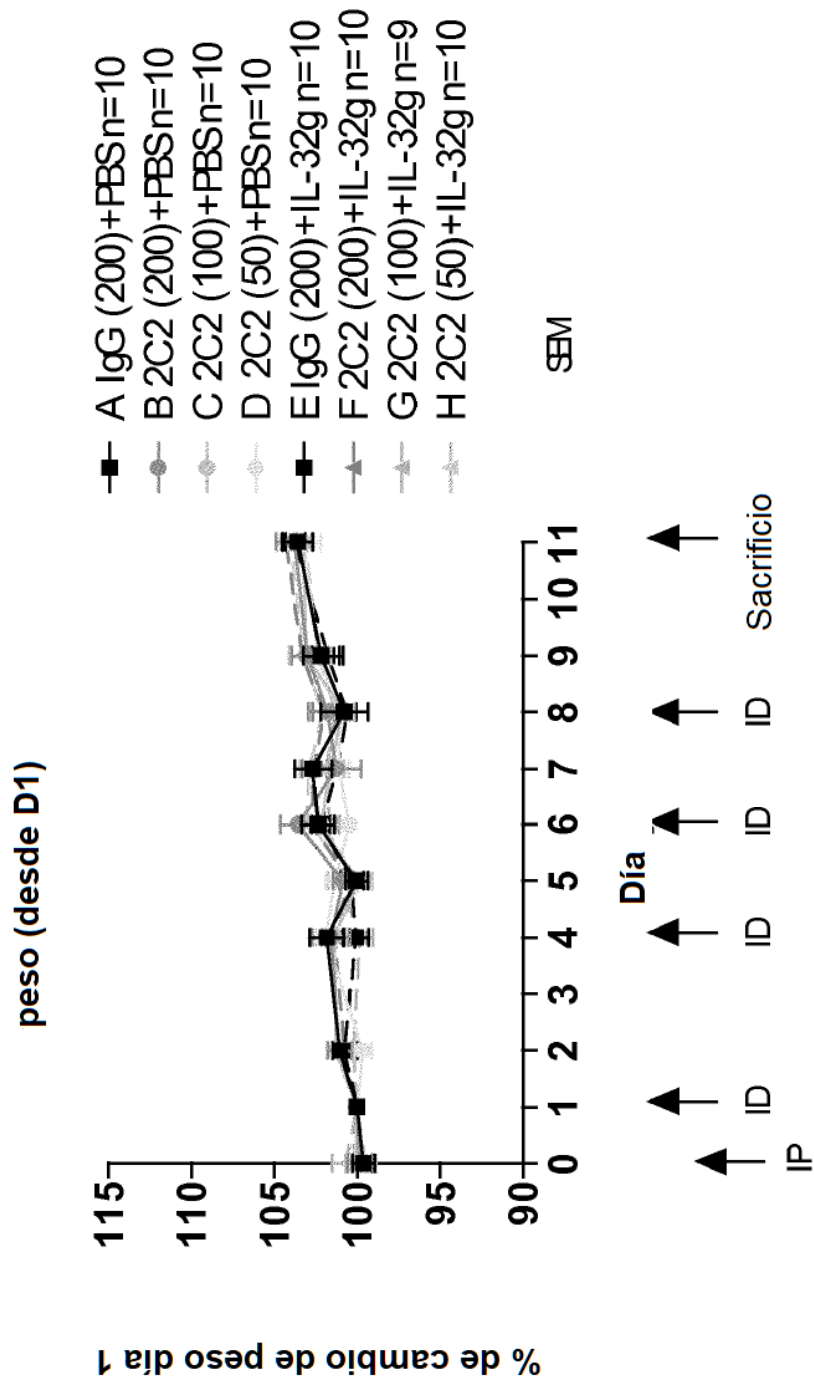


Fig. 7

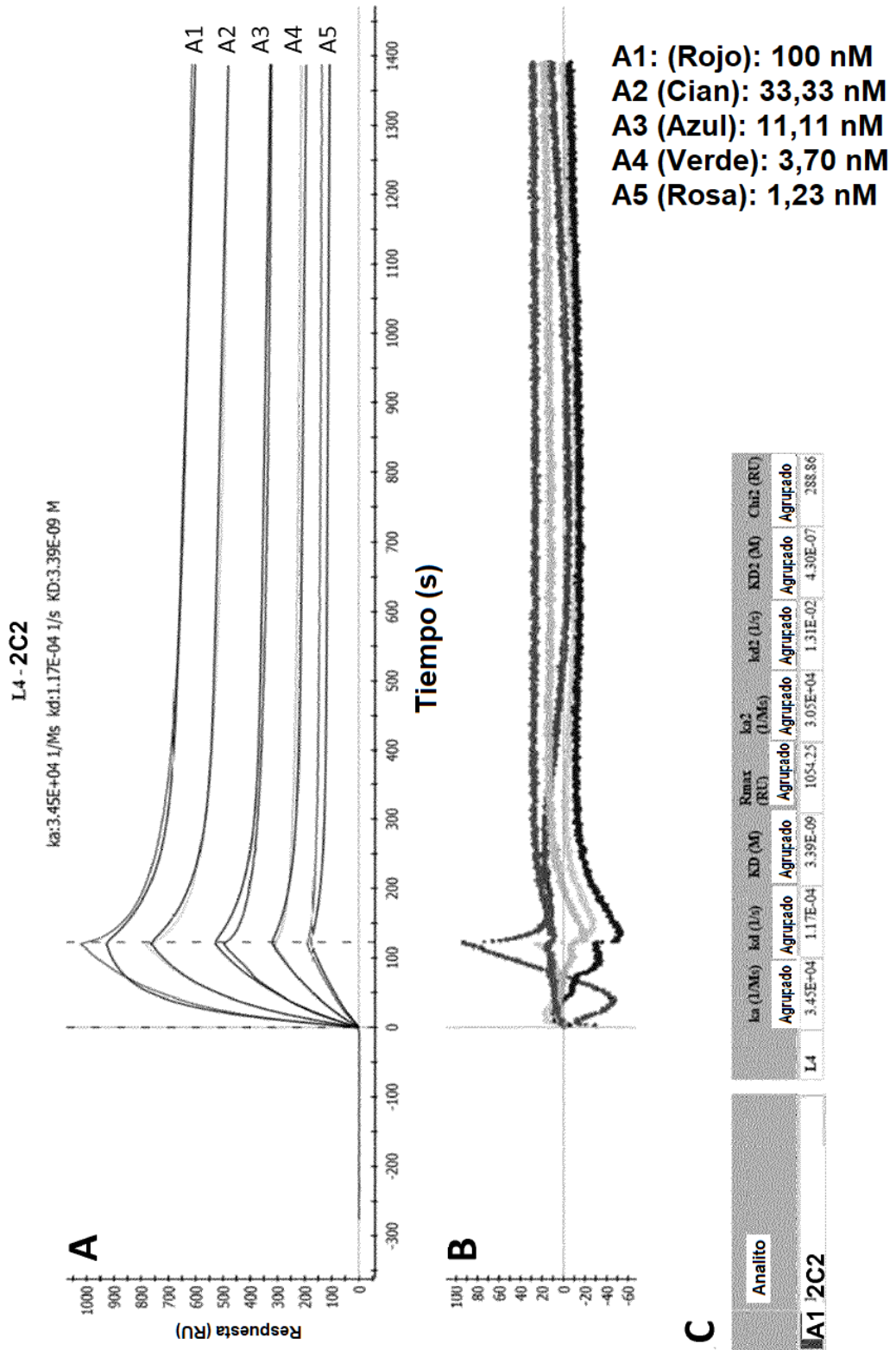
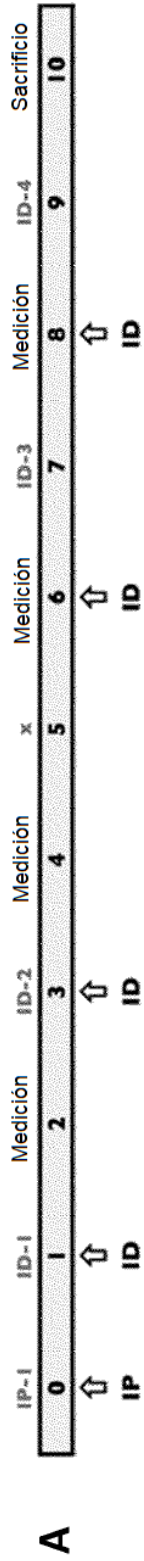


Fig. 8



**B**

Grupo	n	Citoquina	ng/20µl	Abs	[Abs] µg
A	5	PBS	NA	IgG	200
B	5	PBS	NA	2C2	200
C	5	PBS	NA	19A1	200
D	5	PBS	NA	19A1	100
E	5	PBS	NA	19A1	50
F	5	IL-32γ	125	IgG	200
G	5	IL-32γ	125	2C2	200
H	5	IL-32γ	125	19A1	200
I	5	IL-32γ	125	19A1	100
J	5	IL-32γ	125	19A1	50
K	3	NT	x	x	x

**Fig. 9**

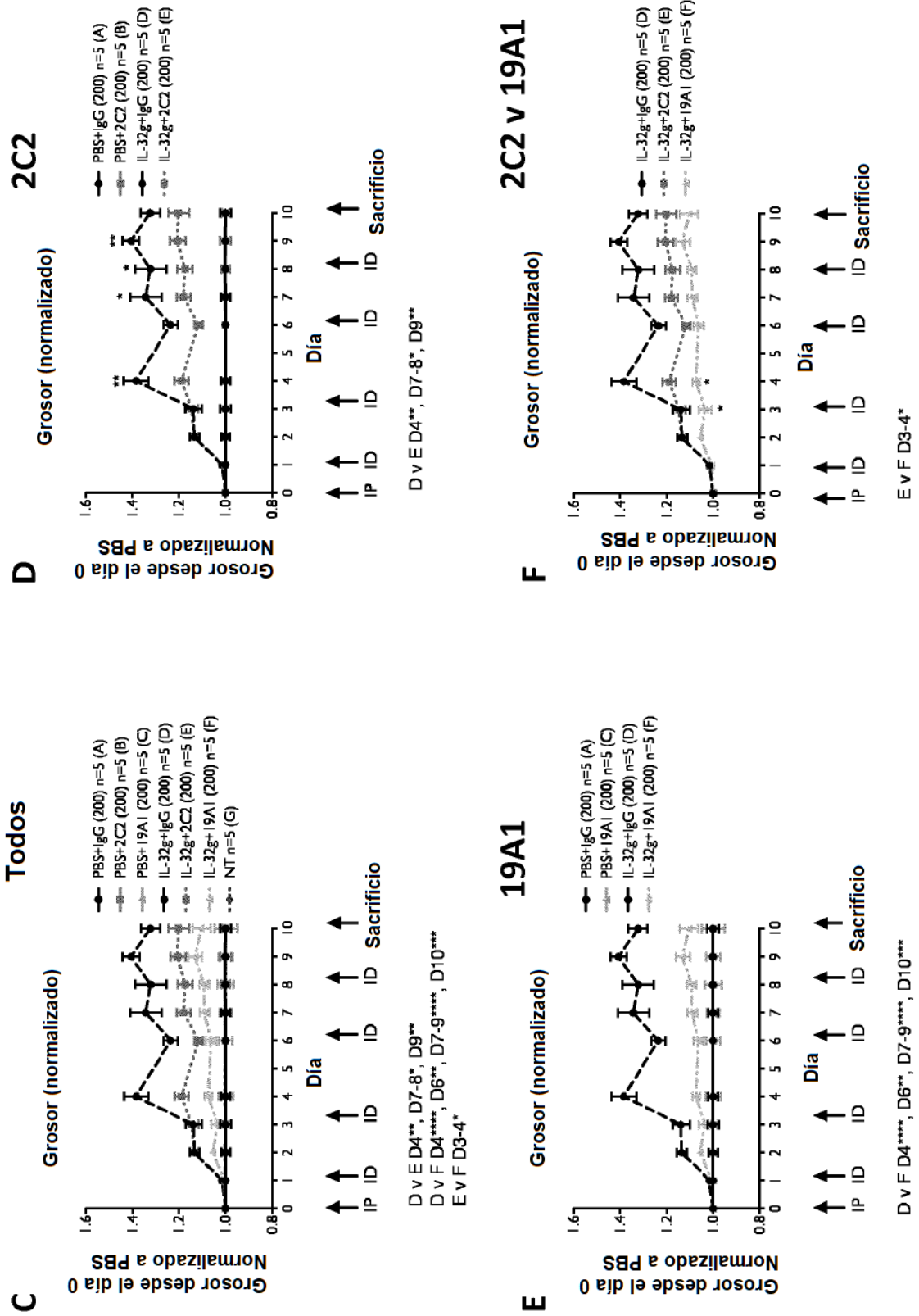


Fig. 9 (continuación)

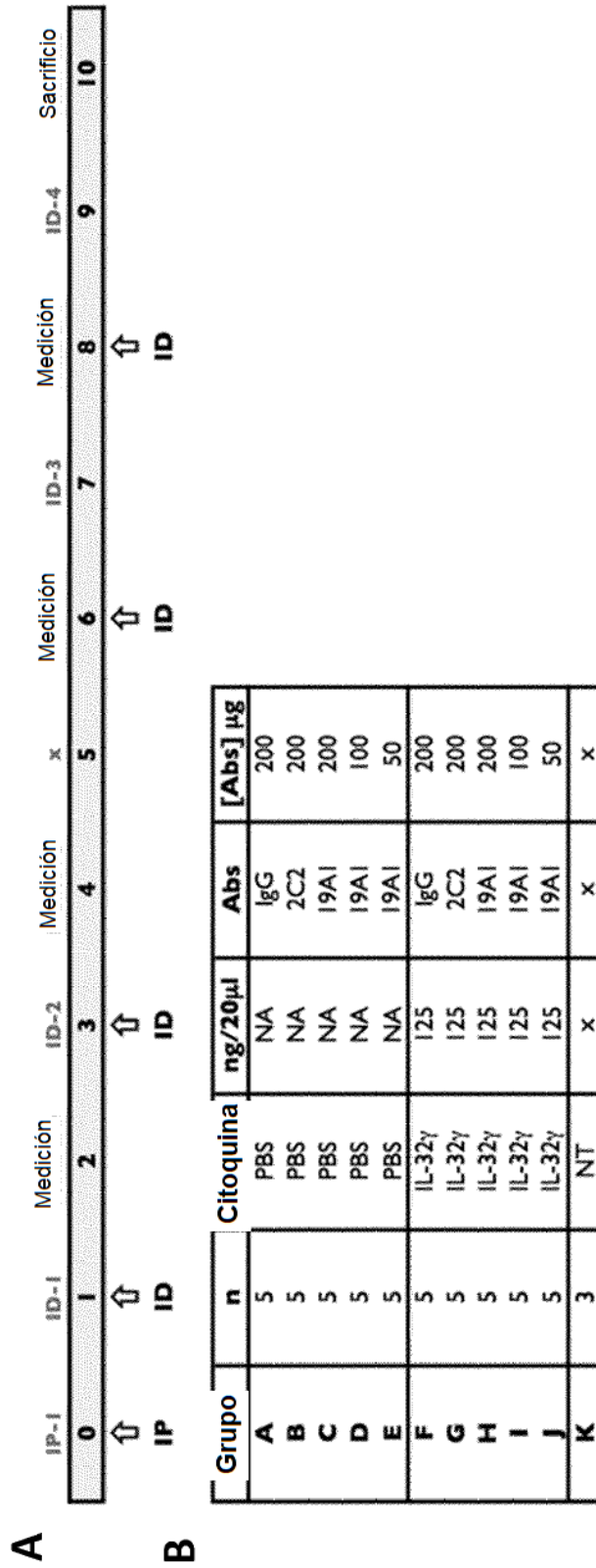


Fig. 10



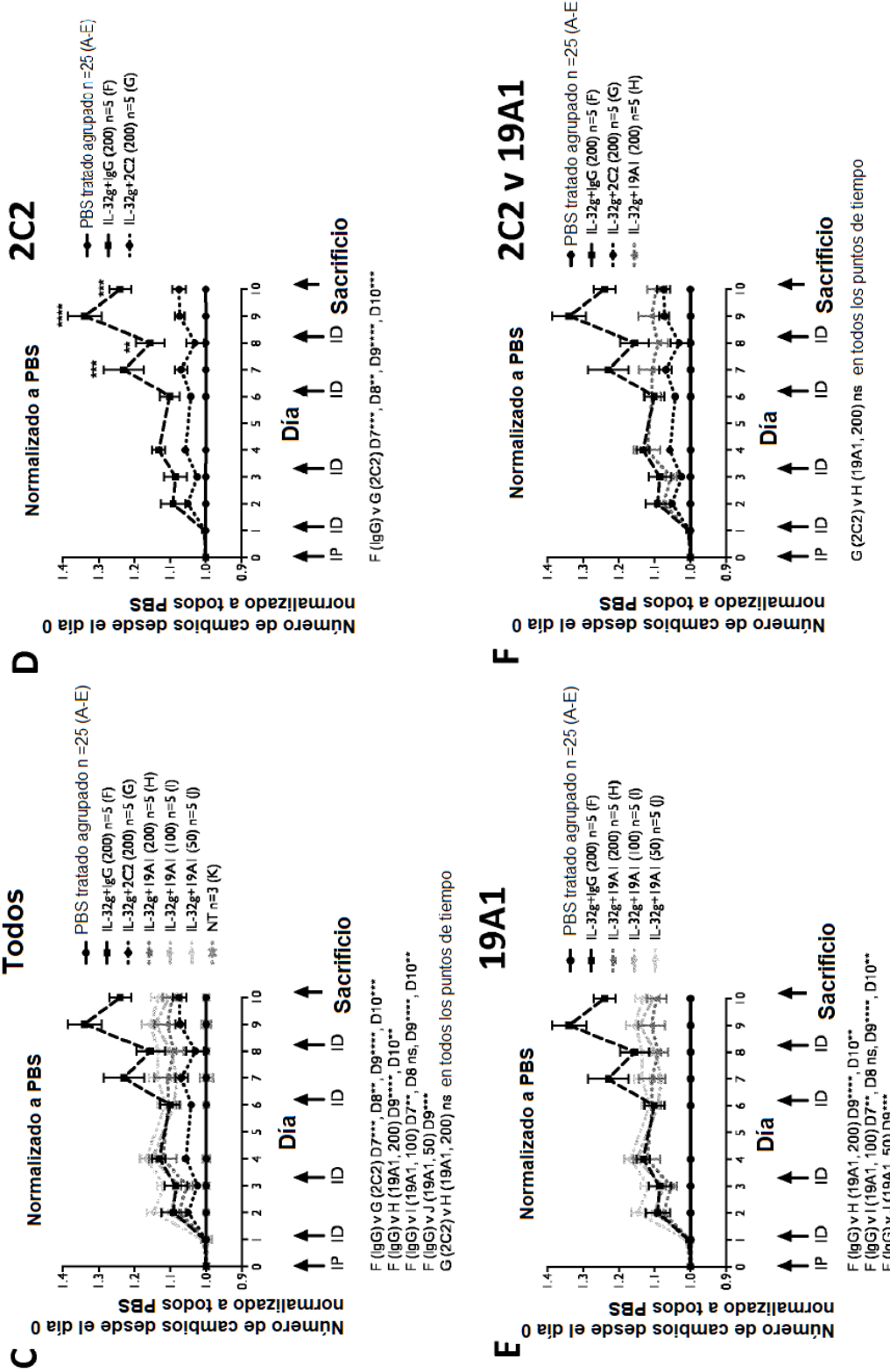
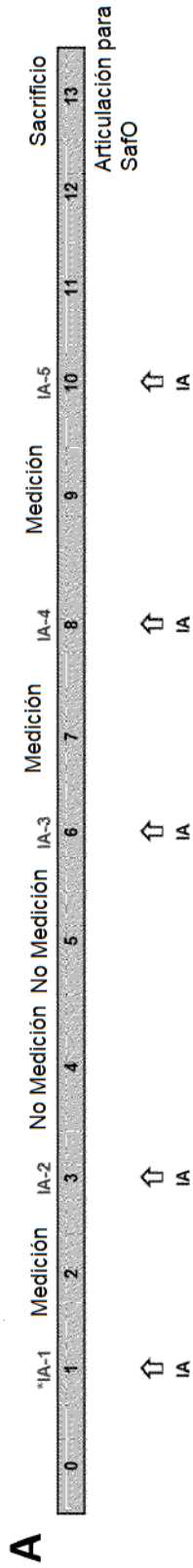


Fig. 10 (Continuación)

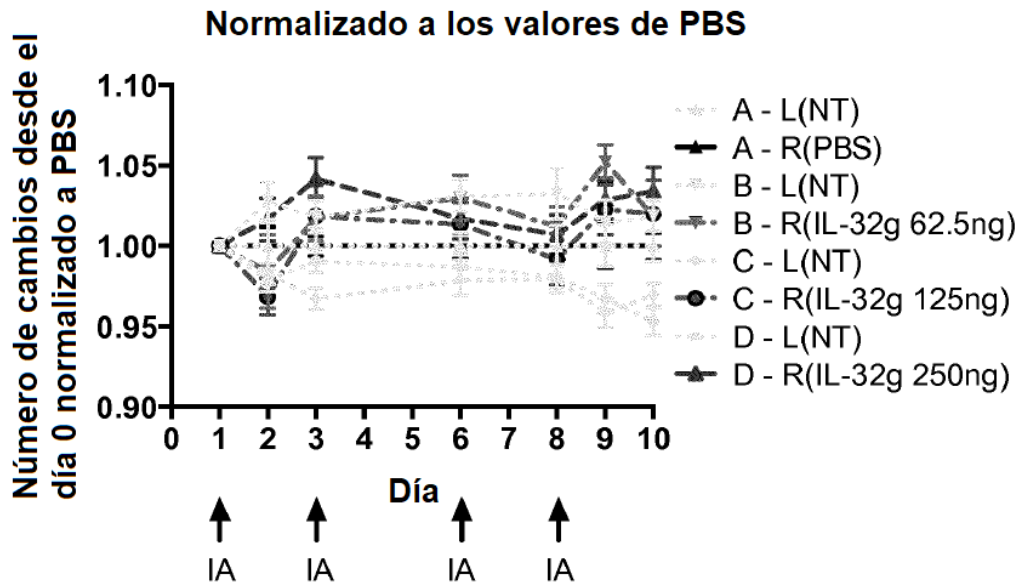


**B**

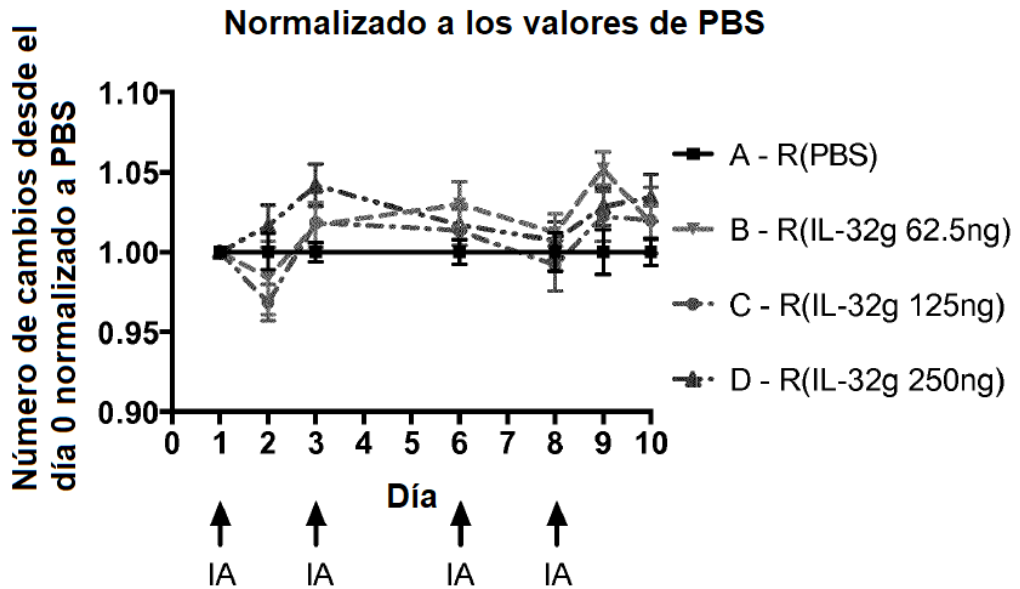
Jaula	n	Tobillo Izq (L)	Tobillo Der. (R)
A1	n=4	NT	PBS
A2	n=4	NT	PBS
B1	n=4	NT	I132g 62.5
B2	n=4	NT	I132g 62.5
C1	n=4	NT	I132g 125
C2	n=4	NT	I132g 125
D1	n=4	NT	I132g 250
D2	n=4	NT	I132g 250
Total	32		

**Fig. 11**

C



D



**Fig. 11 (continuación)**

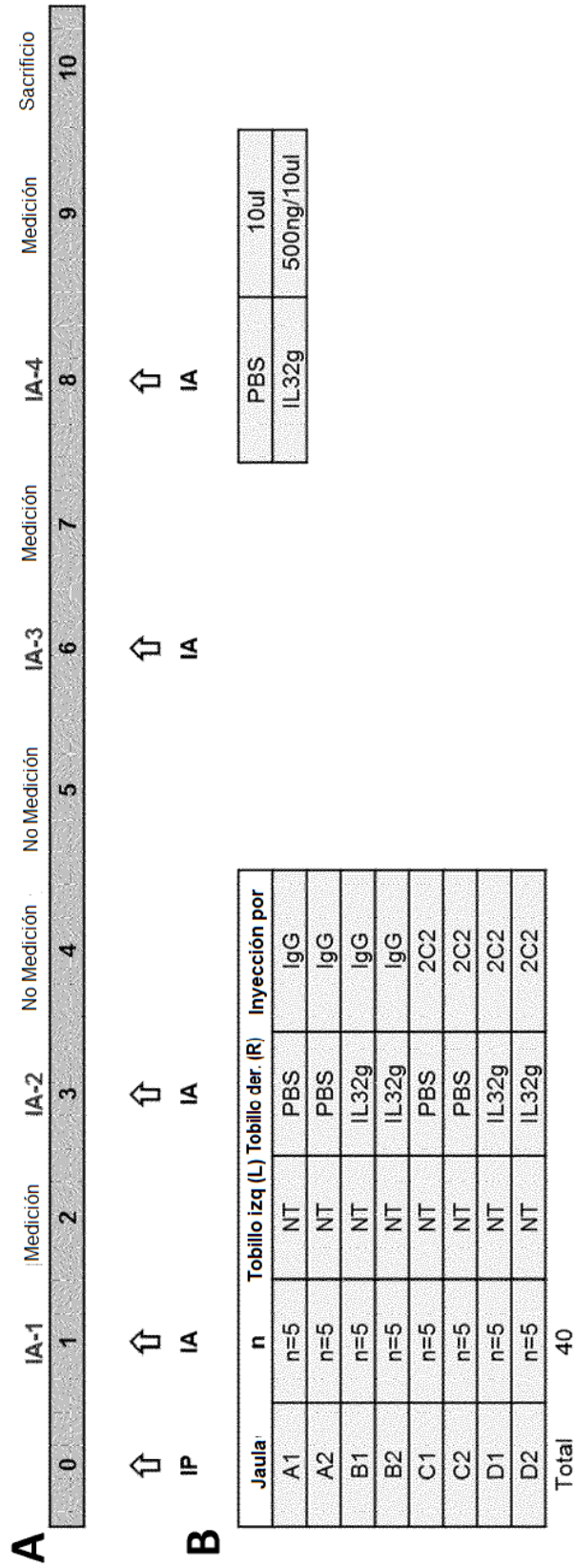
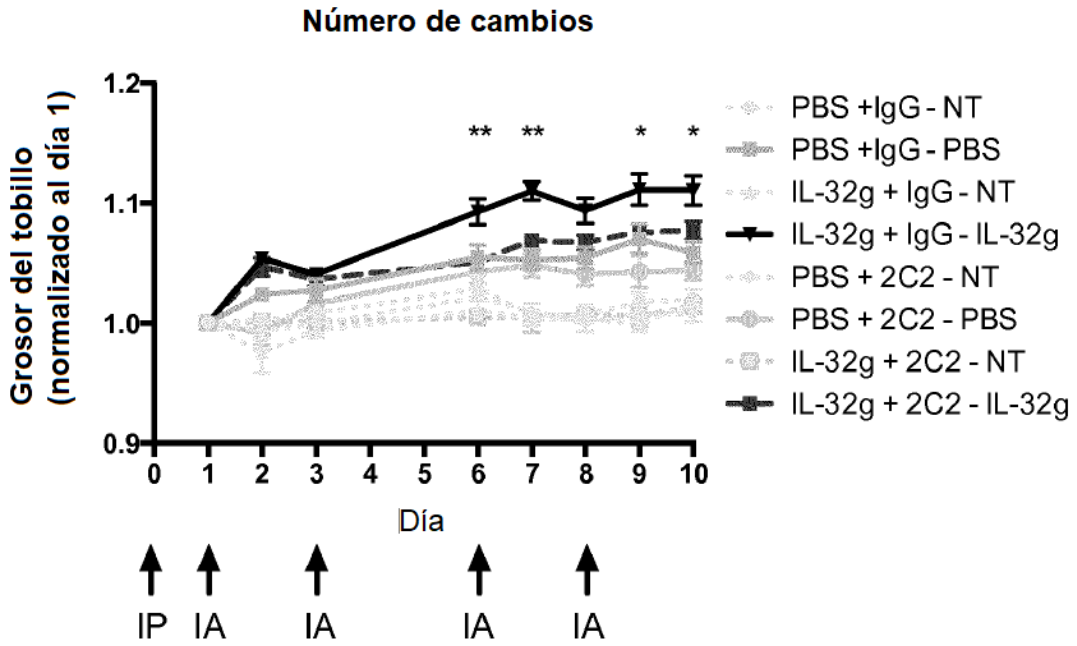
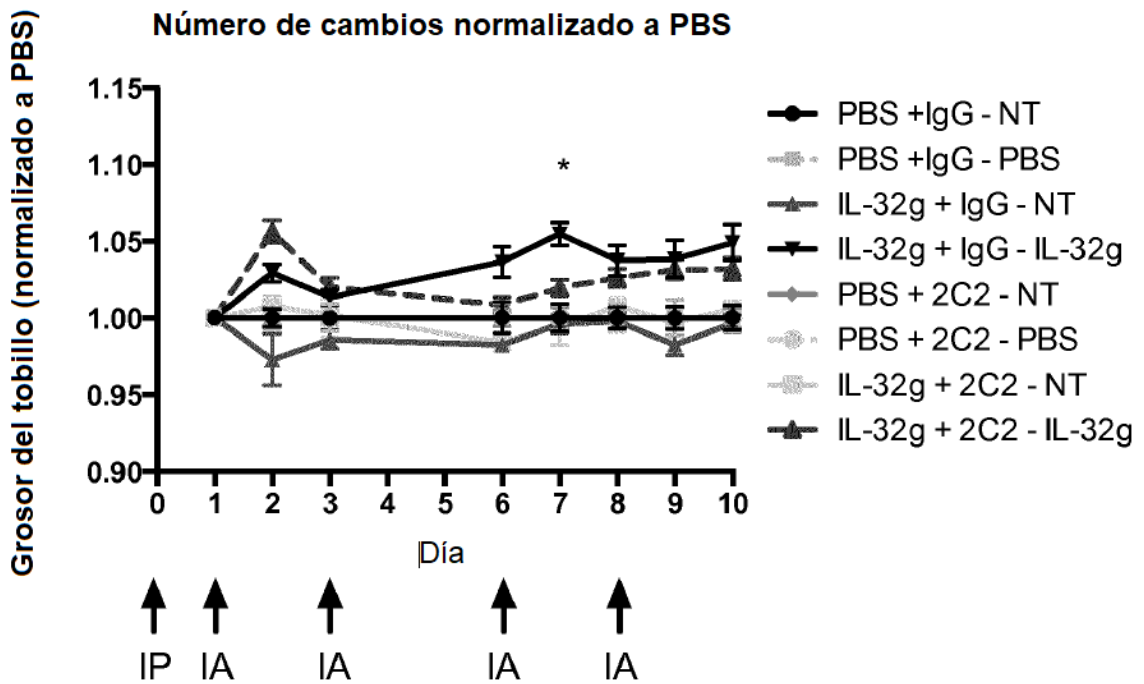


Fig. 12

C

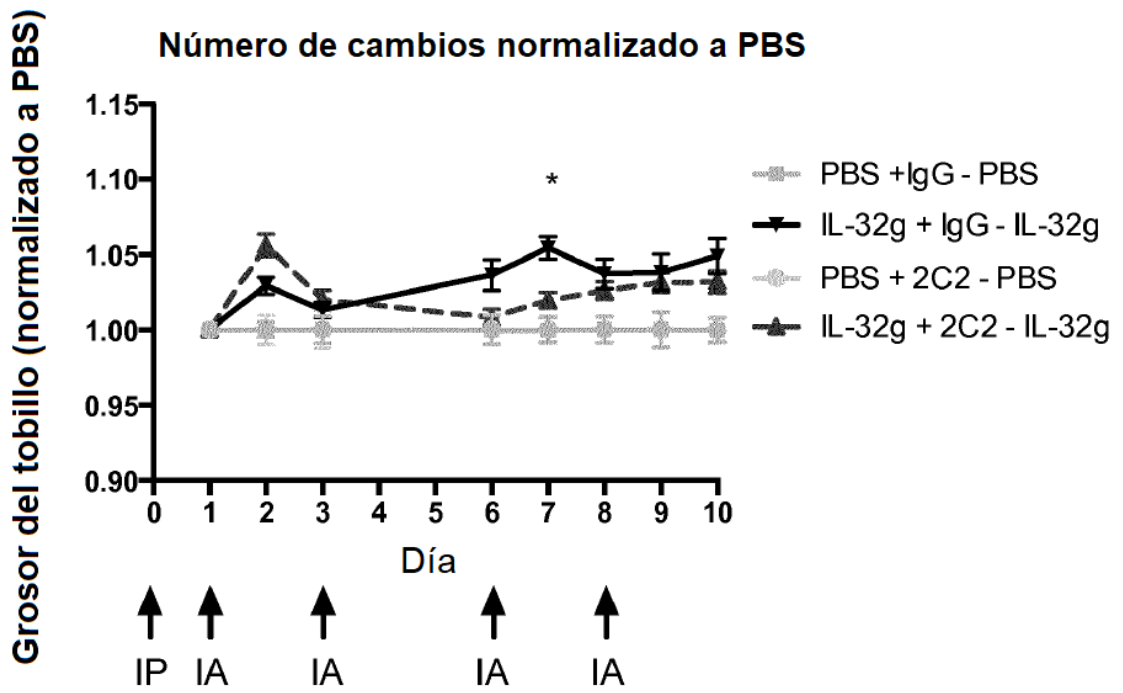


D



**Fig. 12 (continuación)**

E



**Fig. 12 (continuación)**