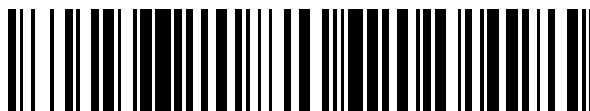


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 804 592**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2014** **PCT/US2014/023930**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2014** **WO14164959**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2014** **E 14722008 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020** **EP 2970460**

54 Título: **Anticuerpos ANTI-IL-33 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

13.03.2013 US 201361778687 P
03.05.2013 US 201361819018 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.02.2021

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591 , US

72 Inventor/es:

MURPHY, ANDREW, J.;
PAPADOPOULOS, NICHOLAS, J. y
ORENGO, JAMIE, M.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 804 592 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 ANTI-IL-33 y usos de los mismos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos, y a fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que son específicos para la IL-33 humana, para usar en un método de tratamiento del asma crónica o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

10 Antecedentes

La interleucina-33 (IL-33) es un ligando para ST2, un miembro de la superfamilia de receptores de tipo Toll/interleucina-1 que se asocia con una proteína auxiliar, IL-1RAcP (para revisiones, véase, por ejemplo, Kakkar y Lee, *Nature Reviews - Drug Discovery* 7(10):827-840 (2008), Schmitz *et al.*, *Immunity* 23:479-490 (2005); Liew *et al.*, *Nature Reviews - Immunology* 10:103-110 (2010); documento US 2010/0260770; documento US 2009/0041718). Tras la activación de ST2/IL-1RAcP por IL-33, se activa una cascada de señalización a través de moléculas en dirección 3', tales como MyD88 (factor 88 de diferenciación mieloide) y TRAF6 (factor 6 asociado al receptor de TNF), lo que conduce a la activación de NFκB (factor nuclear κB), entre otros. La señalización de IL-33 se ha implicado como un factor en una variedad de enfermedades y trastornos. (Liew *et al.*, *Nature Reviews - Immunology* 10:103-110 (2010)).

El documento WO 2005/079844 describe el uso de antagonistas de IL-33 para tratar ciertos trastornos inflamatorios e inmunitarios. Palmer *et al.*, *Nature Reviews - Rheumatology* vol. 7, n.º 6, páginas 321-329 (2011) analizan la biología de IL-33 y su receptor ST2 y los papeles de IL-33 y ST2 en modelos animales de enfermedades y patologías humanas. Hayakawa *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* vol. 282, n. 36 páginas 26369-26380 informan que ST2 soluble bloquea la inflamación alérgica de las vías aéreas por IL-33.

Breve resumen de la invención

La presente divulgación proporciona anticuerpos que se unen a la interleucina-33 humana ("IL-33"). Los anticuerpos son útiles, entre otros, para inhibir la señalización mediada por IL-33 y para tratar enfermedades y trastornos causados por o relacionados con la actividad y/o señalización de IL-33.

En la presente invención, se proporciona un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento de unión al antígeno del mismo para usar en un método de tratamiento del asma crónica o EPOC en un paciente que lo necesite, en donde el método comprende administrar, al paciente, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a la interleucina 33 humana (IL-33) y comprende una región variable de cadena pesada (HCVR, *Heavy Chain Variable Region*) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 274 y una región variable de cadena ligera (LCVR, *Light Chain Variable Region*) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 282.

Los anticuerpos pueden ser de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o IgG4) o pueden comprender únicamente una parte de unión al antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')₂ o scFv) y pueden modificarse para afectar a la funcionalidad, por ejemplo, para eliminar las funciones efectoras residuales (Reddy *et al.*, 2000, *J. Immunol.* 164:1925-1933).

En un caso, los anticuerpos que se unen específicamente a la interleucina-33 humana son anticuerpos monoclonales completamente humanos aislados.

En un caso, los anticuerpos que se unen específicamente a la interleucina-33 humana, o sus fragmentos de unión al antígeno, inhiben o atenúan la señalización mediada por IL-33.

En un caso, los anticuerpos que se unen específicamente a la interleucina-33 humana, o sus fragmentos de unión al antígeno, bloquean la interacción de IL-33 y ST2.

En un caso, los anticuerpos que se unen específicamente a la interleucina-33 humana, o sus fragmentos de unión al antígeno, bloquean la interacción de IL-33 y ST2 con un valor de CI₅₀ inferior a aproximadamente 10 nM o bloquean más de aproximadamente el 50 % de la interacción de IL-33 y ST2 medida en un ensayo de unión de receptor/ligando *in vitro* a 25 °C.

En un caso, los anticuerpos que se unen específicamente a la interleucina-33 humana, o sus fragmentos de unión al antígeno, no bloquean o solo bloquean parcialmente la interacción de IL-33 y ST2.

En un caso, los anticuerpos que se unen específicamente a la interleucina-33 humana, o sus fragmentos de unión al antígeno, se unen a la IL-33 humana con una constante de equilibrio de disociación de unión (K_D) inferior a aproximadamente 1 nM medida en un ensayo de resonancia de plasmón superficial a 37 °C.

En un caso, los anticuerpos que se unen específicamente a la interleucina-33 humana, o sus fragmentos de unión al antígeno, se unen a la IL-33 humana con una semivida disociativa ($t_{1/2}$) superior a aproximadamente 8 minutos, medida en un ensayo de resonancia de plasmón superficial a 37 °C.

- 5 En un caso, los anticuerpos que se unen específicamente a la interleucina-33 humana, o sus fragmentos de unión al antígeno, inhiben la desgranulación mediada por IL-33 de los basófilos humanos.

10 En un caso, los anticuerpos que se unen específicamente a la interleucina-33 humana, o sus fragmentos de unión al antígeno, inhiben la desgranulación mediada por IL-33 de los basófilos humanos con una CI_{50} inferior a aproximadamente 600 pM, medida en una prueba de activación de basófilos *in vitro* (BAT, *Basophil Activation Test*).

15 En un caso, los anticuerpos que se unen específicamente a la interleucina-33 humana, o sus fragmentos de unión al antígeno, inhiben la producción de IFN-gamma mediada por IL-33 a partir de PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) humanas.

20 En un caso, los anticuerpos que se unen específicamente a la interleucina-33 humana, o sus fragmentos de unión al antígeno, inhiben la producción de IFN-gamma mediada por IL-33 a partir de PBMC humanas con una CI_{50} inferior a aproximadamente 25 nM, medida en un ensayo de producción de IFN-gamma de PBMC *in vitro*.

25 En un caso, los anticuerpos que se unen específicamente a la interleucina-33 humana, o sus fragmentos de unión al antígeno, inhiben la producción de IFN-gamma mediada por IL-33 a partir de PBMC humanas con una CI_{50} inferior a aproximadamente 3 nM, medida en un ensayo de producción de IFN-gamma de PBMC *in vitro*.

30 En un caso, los anticuerpos que se unen específicamente a la interleucina-33 humana, o sus fragmentos de unión al antígeno, inhiben la producción de IFN-gamma mediada por IL-33 a partir de PBMC humanas con una CI_{50} inferior a aproximadamente 0,5 nM, medida en un ensayo de producción de IFN-gamma de PBMC *in vitro*.

35 En un caso, los anticuerpos que se unen específicamente a la interleucina-33 humana, o sus fragmentos de unión al antígeno, reducen la frecuencia de los linfocitos T CD4+, eosinófilos y células ILC2 en los pulmones cuando se administran a un modelo animal de inflamación pulmonar inducida por alérgenos.

40 En un caso, los anticuerpos que se unen específicamente a la interleucina-33 humana, o a sus fragmentos de unión al antígeno, reducen el nivel de IL-4 e IL-5 en los pulmones cuando se administran a un modelo animal de inflamación pulmonar inducida por alérgenos.

45 En un caso, los anticuerpos que se unen específicamente a la interleucina-33 humana, o los fragmentos de unión al antígeno de la misma, cuando se administran a un modelo animal de inflamación pulmonar inducida por alérgenos, producen una reducción de al menos 4 veces los niveles de IL-4 y/o una reducción de al menos 5 veces en los niveles de IL-5 en comparación con los animales expuestos a alérgenos que reciben un anticuerpo de control de isotipo.

50 La presente divulgación proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que comprenden una región variable de cadena pesada (HCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 y 308 o una secuencia sustancialmente similar a las mismas, que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia.

55 La presente divulgación también proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298 y 316 o una secuencia sustancialmente similar a las mismas, que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia.

60 La presente divulgación también proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende un par de secuencias de HCVR y LCVR (HCVR/LCVR) seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298 y 308/316. En la invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 274 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 282.

65 La presente divulgación también proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo que comprende un dominio CDR3 de cadena pesada (HCVR3, región determinante de complementariedad de cadena pesada 3, *Heavy Chain Complementarity Determining Region 3*) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296 y 314 o una secuencia sustancialmente similar a las mismas, que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia; y un dominio CDR3 de cadena ligera (LCVR3, Región determinante de complementariedad de cadena ligera 3, *Light Chain Complementarity*

Determining Region 3) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304 y 322 o una secuencia sustancialmente similar a las mismas, que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia.

en determinados casos, el anticuerpo o la parte de unión al antígeno de un anticuerpo comprende un par de secuencias de aminoácidos de HCDR3/LCDR3 seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8/16, 24/32, 40/48, 56/64, 72/80, 88/96, 104/112, 120/128, 136/144, 152/160, 168/176, 184/192, 200/208, 216/224, 232/240, 248/256, 264/272, 280/288, 296/304 y 314/322.

La presente divulgación también proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo que comprende además un dominio CDR1 de cadena pesada (HCDR1) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292 y 310 o una secuencia sustancialmente similar a las mismas, que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia; un dominio CDR2 de cadena pesada (HCDR2) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294 y 312 o una secuencia sustancialmente similar a las mismas, que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia; un dominio CDR1 de cadena ligera (LCDR1) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300 y 318, o una secuencia sustancialmente similar a las mismas, que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia; y un dominio CDR2 de cadena ligera (LCDR2, Región determinante de complementariedad de cadena ligera 2, *Light Chain Complementarity Determining Region 2*) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302 y 320 o una secuencia sustancialmente similar a las mismas, que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia.

Ciertos ejemplos de anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno no limitantes de la divulgación comprenden dominios HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectivamente, que tienen las secuencia de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16 (por ejemplo, H1M9559N); 20-22-24-28-30-32 (por ejemplo, H1M9566N); 36-38-40-44-46-48 (por ejemplo, H1M9568N); 52-54-56-60-62-64 (por ejemplo, H4H9629P); 68-70-72-76-78-80 (por ejemplo, H4H9633P); 84-86-88-92-94-96 (por ejemplo, H4H9640P); 100-102-104-108-110-112 (por ejemplo, H4H9659P); 116-118-120-124-126-128 (por ejemplo, H4H9660P); 132-134-136-140-142-144 (por ejemplo, H4H9662P); 148-150-152-156-158-160 (por ejemplo, H4H9663P); 164-166-168-172-174-176 (por ejemplo, H4H9664P); 180-182-184-188-190-192 (por ejemplo, H4H9665P); 196-198-200-204-206-208 (por ejemplo, H4H9666P); 212-214-216-220-222-224 (por ejemplo, H4H9667P); 228-230-232-236-238-240 (por ejemplo, H4H9670P); 244-246-248-252-254-256 (por ejemplo, H4H9671P); 260-262-264-268-270-272 (por ejemplo, H4H9672P); 276-278-280-284-286-288 (por ejemplo, H4H9675P); 292-294-296-300-302-304 (por ejemplo, H4H9676P); y 310-312-314-318-320-322 (H1M9565N).

En un caso relacionado, la divulgación incluye un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo, que se une específicamente a IL-33, en donde el anticuerpo o fragmento comprende los dominios CDR (Regiones determinantes de complementariedad, *Complementarity Determining Regions*) de cadena pesada y ligera contenidos dentro de las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera (HCVR/LCVR) seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298 y 308/316. Los métodos y las técnicas para identificar las CDR dentro de las secuencias de aminoácidos de HCVR y LCVR son bien conocidos en la técnica, y pueden usarse para identificar las CDR dentro de las secuencias de aminoácidos de HCVR y/o LCVR específicas desveladas en el presente documento. Las convenciones ilustrativas que pueden usarse para identificar los límites de las CDR incluyen, por ejemplo, la definición de Kabat, la definición de Chothia y la definición de AbM. En términos generales, la definición de Kabat se basa en la variabilidad de secuencia, la definición de Chothia se basa en la ubicación de las regiones de bucles estructurales y la definición de AbM es un compendio entre las estrategias de Kabat y Chothia. Véanse, por ejemplo, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); y Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86:9268-9272 (1989). También están disponibles bases de datos públicas para identificar las secuencias de CDR dentro de un anticuerpo.

En otro aspecto, la divulgación proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-IL-33 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos. Los vectores de expresión recombinante que portan los ácidos nucleicos de la divulgación, y células hospedadoras en que se han introducido dichos vectores, también están abarcados por la divulgación, así como métodos de producción de los anticuerpos mediante el cultivo de las células hospedadoras en condiciones que permiten la producción de los anticuerpos y la recuperación de los anticuerpos producidos.

En un caso, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una HCVR codificada

por una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 17, 33, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145, 161, 177, 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289 y 307, o una secuencia sustancialmente idéntica que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de homología de la misma.

La presente divulgación también proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una LCVR codificada por una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9, 25, 41, 57, 73, 89, 105, 121, 137, 153, 169, 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281, 297 y 315, o una secuencia sustancialmente idéntica que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de homología de la misma.

La presente divulgación también proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo que comprende un dominio HCDR3 codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 23, 39, 55, 71, 87, 103, 119, 135, 151, 167, 183, 199, 215, 231, 247, 263, 279, 295 y 313, o una secuencia sustancialmente idéntica que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de homología de la misma; y un dominio LCDR3 codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 15, 31, 47, 63, 79, 95, 111, 127, 143, 159, 175, 191, 207, 223, 239, 255, 271, 287, 303 y 321, o una secuencia sustancialmente idéntica que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de homología de la misma.

La presente divulgación también proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que además comprende un dominio HCDR1 codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 19, 35, 51, 67, 83, 99, 115, 131, 147, 163, 179, 195, 211, 227, 243, 259, 275, 291 y 309, o una secuencia sustancialmente idéntica que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de homología de la misma; un dominio HCDR2 codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 21, 37, 53, 69, 85, 101, 117, 133, 149, 165, 181, 197, 213, 229, 245, 261, 277, 293 y 311, o una secuencia sustancialmente idéntica que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de homología de la misma; un dominio LCDR1 codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 11, 27, 43, 59, 75, 91, 107, 123, 139, 155, 171, 187, 203, 219, 235, 251, 267, 283, 299 y 317, o una secuencia sustancialmente idéntica que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de homología de la misma; y un dominio LCDR2 codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 13, 29, 45, 61, 77, 93, 109, 125, 141, 157, 173, 189, 205, 221, 237, 253, 269, 285, 301 y 319, o una secuencia sustancialmente idéntica que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de homología de la misma.

De acuerdo con determinados casos, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende las secuencias CDR de cadena pesada y ligera codificadas por las secuencias de ácido nucleico de las SEQ ID NO: 1 y 9 (por ejemplo, H1M9559N), 17 y 25 (por ejemplo, H1M9566N), 33 y 41 (por ejemplo, H1M9568N), 49 y 57 (por ejemplo, H4H9629P), 65 y 73 (por ejemplo, H4H9633P), 81 y 89 (por ejemplo, H4H9640P), 97 y 105 (por ejemplo, H4H9659P), 113 y 121 (por ejemplo, H4H9660P), 129 y 137 (por ejemplo, H4H9662P), 145 y 153 (por ejemplo, H4H9663P), 161 y 169 (por ejemplo, H4H9664P), 177 y 185 (por ejemplo, H4H9665P), 193 y 201 (por ejemplo, H4H9666P), 209 y 217 (por ejemplo, H4H9667P), 225 y 233 (por ejemplo, H4H9670P), 241 y 249 (por ejemplo, H4H9671P), 257 y 265 (por ejemplo, H4H9672P), 273 y 281 (por ejemplo, H4H9675P), 289 y 297 (por ejemplo, H4H9676P) o 307 y 315 (H1 M9565N).

Los anticuerpos anti-IL-33 pueden tener un patrón de glucosilación modificado. En algunas aplicaciones, puede ser útil la modificación para retirar sitios de glucosilación no deseados o un anticuerpo que carezca de un resto de fucosa presente en la cadena de oligosacárido, por ejemplo, para aumentar la función de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*) (véase, Shield *et al.*, (2002) *JBC* 277:26733). En otras aplicaciones, se puede realizar la modificación de la galactosilación para modificar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, *Complement Dependent Cytotoxicity*).

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humano recombinante o un fragmento del mismo, que se une específicamente a IL-33 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un aspecto relacionado, la divulgación proporciona una composición que es una combinación de un anticuerpo anti-IL-33 y un segundo agente terapéutico. En un caso, el segundo agente terapéutico es cualquier agente que se combine de forma ventajosa con un anticuerpo anti-IL-33. Los agentes ilustrativos que se pueden combinar de forma ventajosa con un anticuerpo anti-IL-33 incluyen, sin limitación, otros agentes que inhiben la actividad IL-33 (incluyendo otros anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, inhibidores peptídicos, antagonistas de molécula pequeña, etc.) y/o agentes, que no se unen directamente a IL-33, sino que, sin embargo, interfieren con el bloqueo o la atenuación de la señalización mediada por IL-33. En un caso, el segundo agente terapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en un antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un corticoesteroide, un dilatador bronquial, un antihistamínico, epinefrina, un descongestionante, un antagonista de la linfopoyetina del estroma tímico (TSLP, *Thymic Stromal Lymphopoietin*), un antagonista de IL-13, un antagonista de IL-4, un antagonista dual de IL-4/IL-13, un antagonista de IL-5, un antagonista de IL-6, antagonista de IL-12/23, un antagonista de IL-22, un antagonista de IL-25, un antagonista de IL-17, un antagonista de IL-31, un inhibidor oral de PDE4 y otro antagonista de IL-33 o un anticuerpo diferente contra IL-33.

en determinados casos, el antagonista de la citocina puede ser un inhibidor de molécula pequeña (sintético o de origen natural) o una proteína (por ejemplo, un anticuerpo) que interactúa con la propia citocina, o con un receptor de la citocina, o con un complejo que comprende tanto la citocina como su/s receptor/es (por ejemplo, un anticuerpo contra IL-4 o IL-6, o un anticuerpo contra el receptor de IL-4 o IL-6). Terapias de combinación adicionales y formulaciones combinadas que incluyen los anticuerpos anti-IL-33 se desvelan en otra parte del presente documento.

En otro aspecto más, la divulgación proporciona métodos terapéuticos para inhibir la actividad IL-33 usando un anticuerpo anti-IL-33 o una parte de unión al antígeno de un anticuerpo de la divulgación, en donde los métodos terapéuticos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de la divulgación. El trastorno tratado es cualquier enfermedad o afección que se mejore, mitigue, inhiba o prevenga mediante la eliminación, inhibición o reducción de la actividad o señalización de IL-33. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos anti-IL-33 pueden funcionar para bloquear la interacción entre IL-33 y una pareja de unión de IL-33 (por ejemplo, un componente del receptor de IL-33) o inhibir de otro modo la actividad de señalización de IL-33.

En un caso, la divulgación proporciona un método de tratamiento de una enfermedad o un trastorno inflamatorio, o de al menos un síntoma asociado con la enfermedad o el trastorno inflamatorio, comprendiendo el método administrar un anticuerpo que se une específicamente a IL-33 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que se une específicamente a IL-33 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, a un paciente que lo necesite, en donde la enfermedad o el trastorno inflamatorio se alivia, o se reduce su gravedad, duración o frecuencia de aparición, o al menos un síntoma asociado con la enfermedad o el trastorno inflamatorio se alivia, o se reduce su gravedad, duración o frecuencia de aparición.

En un caso, la enfermedad o afección inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en asma, dermatitis atópica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad inflamatoria intestinal, esclerosis múltiple, artritis, rinitis alérgica, esofagitis eosinofílica y psoriasis. En la invención, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno se usa en un método de tratamiento del asma crónica o la EPOC.

En un caso, la divulgación proporciona un método de tratamiento de un paciente que demuestra sensibilidad a un alérgeno, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a IL-33, o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que se une específicamente a IL-33 o a un fragmento de unión al antígeno del mismo, a un paciente que lo necesite, en donde el paciente demuestra una sensibilidad reducida, o una reacción alérgica disminuida contra el alérgeno, o no experimenta ninguna sensibilidad o reacción alérgica, ni una respuesta anafiláctica al alérgeno tras la administración del anticuerpo o de una composición que comprende el anticuerpo.

En un caso, la divulgación proporciona la administración de una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico útil para aliviar la enfermedad o el trastorno inflamatorio, o al menos un síntoma de la enfermedad o del trastorno inflamatorio, o para disminuir una respuesta alérgica a un alérgeno. Como se ha indicado anteriormente, el segundo agente terapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en un antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un corticoesteroide, un dilatador bronquial, un antihistamínico, epinefrina, un descongestionante, un antagonista de la linfopoyetina del estroma tímico (TSLP, *Thymic Stromal Lymphopoietin*), un antagonista de IL-13, un antagonista de IL-4, un antagonista de IL-5, un antagonista de IL-6, un antagonista de IL-25, un antagonista de IL-17 y otro antagonista de IL-33 o un anticuerpo diferente a IL-33.

En un aspecto relacionado, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-IL-33 de la divulgación, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para usar en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno relacionado con o causado por la actividad IL-33 en un paciente. En un caso, la enfermedad o el trastorno relacionado con o causado por la actividad de IL-33 en un paciente es una enfermedad o un trastorno inflamatorio, en donde la enfermedad o el trastorno inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en asma, dermatitis atópica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad inflamatoria intestinal, esclerosis múltiple, artritis, rinitis alérgica, esofagitis eosinofílica y psoriasis.

La presente divulgación también incluye el uso de un anticuerpo anti-IL-33 o una parte de unión al antígeno de un anticuerpo de la divulgación en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno relacionado con o causado por la actividad de IL-33 en un paciente. En un caso, la enfermedad o el trastorno relacionado con o causado por la actividad de IL-33 en un paciente es una enfermedad o un trastorno inflamatorio, en donde la enfermedad o el trastorno inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en asma, dermatitis atópica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad inflamatoria intestinal, esclerosis múltiple, artritis, rinitis alérgica, esofagitis eosinofílica y psoriasis.

Otras realizaciones resultarán evidentes tras la revisión de la descripción detallada adjunta.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Competitividad cruzada entre anticuerpos anti-IL-33 por la IL-33 humana

Figura 2. Competitividad cruzada entre anticuerpos anti-IL-33 por la IL-33 de mono recombinante

Descripción detallada

Antes de describir la presente invención, debe entenderse que la presente invención no se limita a métodos ni condiciones experimentales particulares descritos, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento únicamente tiene el fin de describir realizaciones particulares y no se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando se usa en referencia a un valor numérico indicado particular, significa que el valor puede variar con respecto al valor indicado en no más de un 1 %. Por ejemplo, como se usa en el presente documento, la expresión "aproximadamente 100" incluye 99 y 101, y todos los valores intermedios (por ejemplo, 99,1; 99,2; 99,3; 99,4, etc.).

Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o la prueba de la presente invención, a continuación, se describen los métodos y materiales preferidos.

Definiciones

Las expresiones "interleucina 33", "IL-33" y similares, como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína IL-33 humana como la obtenida de, por ejemplo, R & D Systems, catálogo n.º 3625-IL-010/CF. Todas las referencias a proteínas, los polipéptidos y los fragmentos de proteínas en el presente documento pretenden referirse a la versión humana de la respectiva proteína, polipéptido o fragmento de proteína a menos que se especifique explícitamente que procede de una especie no humana (por ejemplo, "IL-33 de ratón" "IL-33 de mono", etc.).

Como se usa en el presente documento, "un anticuerpo que se une a IL-33" o un "anticuerpo anti-IL-33" incluye anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se unen a un fragmento soluble de una proteína IL-33. Las moléculas de IL-33 solubles incluyen proteínas IL-33 naturales, así como variantes de proteínas IL-33 recombinantes tales como, por ejemplo, Construcciones de IL-33 monoméricas y diméricas.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, significa cualquier molécula o complejo molecular de unión al antígeno que comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR) que se une específicamente a o interacciona con un antígeno particular (por ejemplo, IL-33). El término "anticuerpo" incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, así como multímeros de las mismas (por ejemplo, IgM). Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como LCVR o V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio (C_{L1}). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR, *FRame-work*). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestos desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Los FR del anticuerpo anti-IL-33 (o parte de unión al antígeno del mismo) pueden ser idénticos a las secuencias de la línea germinal humana, o pueden modificarse de manera natural o artificial. Una secuencia consenso de aminoácidos se puede definir basándose en un análisis paralelo de dos o más CDR.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, también incluye fragmentos de unión al antígeno de moléculas de anticuerpo completas. Las expresiones "parte de unión al antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo y similares, como se usa en el presente documento, incluye cualquier polipéptido o glucoproteína de origen natural, que se puede obtener de manera enzimática, sintético o modificado genéticamente que se una específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo pueden obtenerse, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas, usando cualquier técnica convencional adecuada tal como digestión proteolítica o técnicas de ingeniería genética recombinante que implican la manipulación y expresión de ADN que codifica dominios variables, y opcionalmente constantes, de anticuerpo. Dicho ADN se conoce y/o se puede adquirir fácilmente de, por ejemplo, fuentes comerciales, bibliotecas de ADN (incluyendo, por ejemplo, fagotecas de anticuerpos), o puede sintetizarse. El ADN puede secuenciarse y manipularse químicamente o usando técnicas de biología molecular, por ejemplo, para disponer uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear restos de cisteína, modificar, añadir o suprimir aminoácidos, etc.

Los ejemplos no limitantes de fragmentos de unión al antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos $F(ab')_2$;

(iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades de reconocimiento mínimo que consisten en los restos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, tal como un péptido CDR3) o un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido. Otras moléculas modificadas por ingeniería genética, tales como anticuerpos

específicos de dominio, anticuerpos de un solo dominio, anticuerpos de dominio suprimido, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados con CDR, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (por ejemplo, nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etc.), agentes inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP, *Small Modular ImmunoPharmaceuticals*) y dominios IgNAR variables de tiburón, también se abarcan dentro de la expresión "fragmento de unión al antígeno", como se usa en el presente documento.

Un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo normalmente comprenderá al menos un dominio variable. El dominio variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos y generalmente comprenderá al menos una CDR que está adyacente a o en fase con una o más secuencias marco. En fragmentos de unión al antígeno que tienen un dominio V_H asociado con un dominio V_L, los dominios V_H y V_L pueden situarse uno con respecto al otro en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimérica y contener los dímeros V_H-V_H, V_H-V_L o V_L-V_L. Como alternativa, el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio V_H o V_L monomérico.

Un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable unido covalentemente a al menos un dominio constante. Las configuraciones ilustrativas no limitantes de dominios variables y constantes que pueden encontrarse dentro de un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo incluyen: (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_H1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3; y (xiv) V_L-C_L. En cualquier configuración de dominios variables y constantes, incluyendo cualquiera de las configuraciones ilustrativas enumeradas anteriormente, los dominios variables y constantes pueden estar unidos directamente entre sí o pueden estar unidos mediante una región bisagra o conectora completa o parcial. Una región bisagra puede consistir en al menos 2 (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos que dan como resultado una unión flexible o semiflexible entre dominios variables y/o constantes adyacentes en una única molécula polipeptídica. Por otra parte, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo puede comprender un homodímero o heterodímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de dominio variable y constante enumeradas anteriormente en asociación no covalente entre sí y/o con uno o más dominios V_H o V_L monoméricos (por ejemplo, mediante uno o más enlaces disulfuro).

Como ocurre con las moléculas de anticuerpo completas, los fragmentos de unión al antígeno pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos). Un fragmento de unión al antígeno multiespecífico de un anticuerpo normalmente comprenderá al menos dos dominios variables diferentes, en donde cada dominio variable puede unirse específicamente con un antígeno distinto o con un epítopo diferente en el mismo antígeno. Cualquier formato de anticuerpo multiespecífico, incluyendo los formatos de anticuerpo biespecífico ilustrativos desvelados en el presente documento, puede adaptarse para usar en el contexto de un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo usando técnicas rutinarias disponibles en la técnica.

Los anticuerpos pueden funcionar mediante citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). "Citotoxicidad dependiente del complemento" (CDC) se refiere a la lisis de células que expresan antígeno por un anticuerpo en presencia del complemento. "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" (ADCC) se refiere a una reacción mediada por células, en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc (FcR) (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana, conduciendo así a la lisis de la célula diana. La CDC y la ADCC pueden medirse usando ensayos que son bien conocidos y que están disponibles en la técnica. (Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 5.500.362 y 5.821.337, y Clynes *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci.* (EE.UU.) 95:652-656). La región constante de un anticuerpo es importante en la capacidad de un anticuerpo de fijar el complemento y mediar la citotoxicidad dependiente de células. Por tanto, el isotipo de un anticuerpo puede seleccionarse basándose en si se desea que el anticuerpo medie la citotoxicidad.

En determinados aspectos de la divulgación, los anticuerpos anti-IL-33 son anticuerpos humanos. En la invención, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento de unión al antígeno del mismo. La expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir restos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y, en particular, CDR3. Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las CDR procedentes de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como de un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.

Los anticuerpos pueden, en algunos casos, ser anticuerpos humanos recombinantes. La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante introducido por transfección en una célula hospedadora (descrito en más detalle

posteriormente), anticuerpos aislados de una biblioteca combinatoria de anticuerpos humanos, recombinante (descrita más adelante), anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor *et al.* (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295) o anticuerpos preparados, se expresan, se crean o se aíslan mediante cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana en otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. en determinados casos, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque proceden de, y están relacionadas con, secuencias de V_H y V_L de línea germinal humana, no pueden existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Los anticuerpos humanos pueden existir en dos formas que están asociadas con la heterogeneidad de bisagra. En una forma, una molécula de inmunoglobulina comprende una construcción de cuatro cadenas estable de aproximadamente 150-160 kDa en la que los dímeros se mantienen juntos por un enlace disulfuro intercatenario de la cadena pesada. En una segunda forma, los dímeros no están unidos mediante enlaces disulfuro intercatenarios y se forma una molécula de aproximadamente 75-80 kDa compuesta de una cadena ligera y pesada acopladas covalentemente (semianticuerpo). Estas formas han sido extremadamente difíciles de separar, incluso después de purificación por afinidad.

La frecuencia de aparición de la segunda forma en diversos isotipos de IgG intacta se debe a, pero sin limitación, diferencias estructurales asociadas con el isotipo de la región bisagra del anticuerpo. Una sustitución de un único aminoácido en la región bisagra de la bisagra de IgG4 humana puede reducir significativamente la aparición de la segunda forma (Angal *et al.* (1993) *Molecular Immunology* 30:105) hasta los niveles normalmente observados usando una bisagra de IgG1 humana. Los anticuerpos pueden tener una o más mutaciones en la bisagra, C_H2 o C_H3, que pueden ser deseables, por ejemplo, en la producción, para mejorar el rendimiento de la forma de anticuerpo deseada.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos aislados. Un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, significa un anticuerpo que se ha identificado y separado y/o recuperado de al menos un componente de su entorno natural. Por ejemplo, un anticuerpo que se ha separado o retirado de al menos un componente de un organismo, o de un tejido o célula en la que existe de forma natural o se produce de forma natural el anticuerpo, es un "anticuerpo aislado". Un anticuerpo aislado también incluye un anticuerpo *in situ* dentro de una célula recombinante. Los anticuerpos aislados son anticuerpos que se han sometido a al menos una etapa de purificación o aislamiento. Un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o agentes químicos.

La presente divulgación incluye anticuerpos neutralizantes y/o bloqueantes anti-IL-33. Un anticuerpo "neutralizante" o "bloqueante", como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a un anticuerpo cuya unión a IL-33: (i) interfiere con la interacción entre IL-33 o un fragmento de IL-33 y un componente del receptor de IL-33 (por ejemplo, ST2, IL-1 RAcP, etc.); e/o (ii) produce la inhibición de al menos una función biológica de IL-33. La inhibición causada por un anticuerpo neutralizante o bloqueante de IL-33 no tiene que ser completa siempre que sea detectable usando un ensayo apropiado. En los ejemplos de trabajo del presente documento, se describen ensayos ilustrativos para detectar la inhibición de IL-33.

Los anticuerpos anti-IL-33 desvelados en el presente documento pueden comprender una o más sustituciones de aminoácidos, inserciones y/o deleciones en las regiones marco y/o regiones CDR de los dominios variables de la cadena pesada y ligera en comparación con las secuencias de la línea germinal correspondientes de las que se derivaron los anticuerpos. Dichas mutaciones pueden averiguarse fácilmente comparando las secuencias de aminoácidos desveladas en el presente documento con secuencias de la línea germinal disponibles en, por ejemplo, bases de datos de secuencias de anticuerpos públicas. Los anticuerpos o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se pueden obtener a partir de cualquiera de las secuencias de aminoácidos desveladas en el presente documento, en donde uno o más aminoácidos dentro de una o más regiones marco y/o CDR están mutados en el resto o restos correspondientes de la secuencia de la línea germinal de la que se obtuvo el anticuerpo, o en el resto o restos correspondientes de otra secuencia de la línea germinal humana, o en una sustitución de aminoácidos conservativa del resto o restos de la línea germinal correspondientes (dichos cambios de secuencia se mencionan en el presente documento colectivamente como "mutaciones de la línea germinal"). Un experto en la materia, partiendo con las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera desveladas en el presente documento, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno que comprenden una o más mutaciones de la línea germinal individuales o combinaciones de las mismas. en determinados casos, todos los restos marco y/o CDR dentro de los dominios V_H y/o V_L vuelven a mutar a los restos encontrados en la secuencia de la línea germinal humana de la que se obtuvo el anticuerpo. En otros casos, únicamente determinados restos vuelven a mutar a la secuencia de la línea germinal original, por ejemplo, únicamente los restos mutados encontrados dentro de los primeros 8 aminoácidos de FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de FR4, o únicamente los restos mutados encontrados dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otros casos, uno o más de los restos marco y/o CDR pueden mutarse al resto o restos correspondientes de una secuencia de la línea germinal diferente (es decir, una secuencia de la línea germinal que es diferente de la secuencia de la línea germinal de la que se obtuvo originalmente el anticuerpo). Asimismo, los anticuerpos pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de la línea germinal

dentro de las regiones flanqueantes y/o CDR, por ejemplo, en donde determinados restos individuales están mutados al resto correspondiente de una secuencia de la línea germinal particular mientras que otros restos determinados que difieren de la secuencia de la línea germinal original se mantienen o están mutados al resto correspondiente de una secuencia de la línea germinal diferente. Una vez obtenidos, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno que

- 5 contienen una o más mutaciones de la línea germinal pueden probarse fácilmente con respecto a una o más propiedades deseadas tales como, mejor especificidad de unión, mayor afinidad de unión, propiedades biológicas antagonista o agonistas mejoradas o potenciadas (según pueda ser el caso), menor inmunogenicidad, etc. Dentro de la presente divulgación, se incluyen anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno obtenidos de esta manera general.
- 10 La presente divulgación también incluye anticuerpos anti-IL-33 que comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR desveladas en el presente documento que tienen una o más sustituciones conservativas. Por ejemplo, los anticuerpos anti-IL-33 pueden tener secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR con, por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc. sustituciones conservativas de aminoácidos en relación con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR
- 15 desveladas en el presente documento.

El término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión al antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como parátipo. Un único antígeno puede tener más de un epítipo. Por tanto, diferentes anticuerpos pueden unirse a diferentes áreas en un antígeno o puede tener diferentes efectos biológicos. Los epítipos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítipo conformacional se produce por yuxtaposición espacial de aminoácidos de diferentes segmentos de la cadena de polipéptido lineal. Un epítipo lineal es aquel producido por restos de aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica. En determinadas circunstancias, un epítipo puede incluir restos de sacáridos, grupos fosforilo o grupos sulfonilo en el antígeno.

- 20 La expresión "identidad sustancial" o "sustancialmente idéntico", cuando hace referencia a un ácido nucleico o fragmento del mismo, indica que, cuando se alinea de forma óptima con inserciones o eliminaciones de nucleótidos apropiadas con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), existe identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente un 95 % y, más preferentemente, al menos aproximadamente un 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de las bases nucleotídicas, medida por cualquier algoritmo bien conocido de identidad de secuencias, tal como FASTA, BLAST o Gap, como se analiza a continuación. Una molécula de ácido nucleico que tiene identidad sustancial con una molécula de ácido nucleico de referencia puede, en determinados casos, codificar un polipéptido que tenga la misma secuencia de aminoácidos o una sustancialmente similar que el polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de referencia.

- 35 Aplicada a polipéptidos, la expresión "similitud sustancial" o "sustancialmente similar" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean de forma óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de hueco predeterminadas, comparten al menos un 95 % de identidad de secuencia, incluso más preferentemente al menos un 98 % o 99 % de identidad de secuencia. Preferentemente, las posiciones de los restos que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservativas. Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en la que un resto de aminoácido está sustituido por otro resto de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácidos conservativa no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en los que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencia o grado de similitud puede ajustarse al alza para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Los medios para hacer este ajuste son bien conocidos para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen (1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) cadenas laterales hidroxilo-alifáticas: serina y treonina; (3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; (4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; (5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; (6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato; y (7) cadenas laterales que contienen azufre que son cisteína y metionina. Son grupos de sustitución de aminoácidos conservativa preferidos: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. Como alternativa, un remplazo conservativo es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 desvelada en Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-1445.
- 50 Un remplazo "moderadamente conservativo" es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

La similitud de secuencia para polipéptidos, que también se menciona como identidad de secuencia, se mide normalmente usando un programa informático de análisis de secuencias. El programa informático de análisis de proteínas empareja secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones de aminoácidos conservativas. Por ejemplo, el programa informático GCG contiene programas tales como Gap y Bestfit que pueden usarse con parámetros por defecto para determinar la homología de secuencia o la identidad de secuencia entre polipéptidos muy relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo silvestre y una mutante de la misma. Véase, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Las secuencias polipeptídicas también pueden compararse usando FASTA usando parámetros por defecto o recomendados, un programa en GCG Versión 6.1.

FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineaciones y porcentajes de identidad de secuencia de las regiones del mejor solapamiento entre las secuencias de consulta y de búsqueda (Pearson (2000) *supra*). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia con una base de datos que contiene una gran cantidad de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, usando parámetros por defecto. Véase, por ejemplo, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 y Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.

Una "enfermedad o trastorno inflamatorio", como se usa en el presente documento, se refiere a una enfermedad, trastorno o afección patológica donde la patología se debe, total o parcialmente, a, por ejemplo, un cambio en el número, cambio en la tasa de migración o cambio en la activación, de células del sistema inmunitario. Las células del sistema inmunitario incluyen, por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, monocitos o macrófagos, células presentadoras de antígeno (APC, *Antigen Presenting Cells*), células dendríticas, microglía, linfocitos NK, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos o cualquier otra célula asociada específicamente con la inmunología, por ejemplo, células endoteliales o epiteliales productoras de citocinas. Como se usa en el presente documento, en un caso, la "enfermedad o el trastorno inflamatorio" es una enfermedad o un trastorno inmunitario seleccionado del grupo que consiste en asma, (incluyendo asma resistente a esteroides, asma sensible a esteroides, asma eosinofílica o asma no eosinofílica, alergia, anafilaxia, esclerosis múltiple, trastorno inflamatorio intestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC, que puede o no estar relacionada con, causada en parte por, o deberse a, la exposición al humo del tabaco directa o indirectamente), lupus, dermatitis atópica, psoriasis, esclerodermia y otras enfermedades fibróticas, síndrome de Sjogren, vasculitis (enfermedad de Behcet, arteritis de células gigantes, púrpura de Henoch-Schonlein y síndrome de Churg Strauss) y artritis. En otro ejemplo, la artritis se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, osteoartritis y artritis psoriásica. En otro caso, la "enfermedad o el trastorno inflamatorio" es una enfermedad o un trastorno inmunitario que comprende una respuesta de tipo TH₁ o una respuesta de tipo TH₂.

La expresión "inhibe o atenúa la señalización mediada por IL-33", como se usa en el presente documento, se refiere al grado en que IL-33 estimula la transducción de señales a través de ST2 e IL-1RAcP, que disminuye en presencia de un antagonista, tal como un anticuerpo IL-33 como se describe en el presente documento, en relación con el grado en que IL-33 estimula la transducción de señales a través de ST2 e IL-1RAcP en ausencia del antagonista tal como un anticuerpo IL-33 como se describe en el presente documento. Para examinar el alcance de la inhibición, se trata una muestra con un inhibidor/antagonista potencial y se compara con una muestra de control sin el inhibidor/antagonista. Las muestras de control, es decir, no tratadas con antagonista, reciben un valor de actividad relativa del 100 %. La inhibición se logra cuando el valor de la actividad en relación con el control es de aproximadamente el 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 % o 20 %, o inferior. Un criterio de valoración en la inhibición puede comprender una cantidad o un porcentaje predeterminado de, por ejemplo, un indicador de inflamación, o desgranulación, secreción o activación celular, tal como la liberación de una citocina. La inhibición de la transducción de señales de IL-33 a través de ST2 e IL-1RAcP se puede determinar analizando la transducción de señales de IL-33 en un ensayo *in vitro*, tal como el que se describe en el presente documento en el Ejemplo 6. Además, se pueden usar ensayos *in vivo* para determinar si una molécula es un antagonista de IL-33. Por ejemplo, se puede usar un ensayo *in vivo* como el descrito en los Ejemplos 11 y 12 para evaluar el efecto de un anticuerpo contra IL-33 sobre la inflamación pulmonar en animales sensibilizados con alérgenos que son homocigotos para la expresión de IL-33 humana. Tras la sensibilización de los animales con alérgeno, se trata un subconjunto de los animales con un anticuerpo anti-IL-33 como se describe en el presente documento o con un anticuerpo de control de isotipo negativo. Después, se sacrifican los animales y se recogen los pulmones para evaluar los infiltrados celulares, así como realizar mediciones de citocinas (IL-4 e IL-5). Un anticuerpo IL-33 que sea eficaz como antagonista debería demostrar una tendencia hacia la reducción de las células inflamatorias en el pulmón, así como una tendencia hacia la reducción de citocinas tales como IL-4 e IL-5.

Características biológicas de los anticuerpos

La presente divulgación incluye anticuerpos anti-IL-33 y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen a IL-33 humana e inhiben o atenúan la señalización mediada por IL-33. Se considera que un anticuerpo anti-IL-33 "inhibe o atenúa la señalización mediada por IL-33" si, por ejemplo, el anticuerpo presenta una o más propiedades seleccionadas del grupo que consiste en: (1) inhibición de la señalización mediada por IL-33 en un bioensayo basado en células; (2) inhibición de la desgranulación inducida por IL-33 de basófilos humanos; (3) inhibición de la producción de IFN γ inducida por IL-33 a partir de PBMC humanas; (4) reducción en los niveles de citocinas que están elevados en un mamífero como resultado de la exposición a un alérgeno, por ejemplo, IL-4 o IL-5; e (5) inhibición de la inflamación pulmonar resultante de la exposición aguda o crónica a un alérgeno (por ejemplo, ácaros del polvo doméstico (HDM, *House Dust Mites*)).

La inhibición de la señalización mediada por IL-33 en un bioensayo basado en células significa que un anticuerpo anti-IL-33 o su fragmento de unión al antígeno inhibe o reduce la señal producida en las células que expresan un receptor de IL-33 y un elemento indicador que produce una señal detectable en respuesta a la unión de IL-33, por ejemplo, usando el formato de ensayo que se define en el Ejemplo 6 del presente documento, o un ensayo sustancialmente similar. Por ejemplo, los anticuerpos y sus fragmentos de unión al antígeno pueden bloquear la señalización mediada por IL-33 en células que expresan ST2 humano, con una IC₅₀ inferior a aproximadamente 2 μ M, inferior a aproximadamente 1 nM, inferior a aproximadamente 900 pM, inferior a aproximadamente 800 pM, inferior a

aproximadamente 700 pM, inferior a aproximadamente 600 pM, inferior a aproximadamente 500 pM, inferior a aproximadamente 400 pM, inferior a aproximadamente 350 pM, inferior a aproximadamente 300 pM, inferior a aproximadamente 250 pM, inferior a aproximadamente 200 pM, inferior a aproximadamente 150 pM, inferior a aproximadamente 100 pM, inferior a aproximadamente 90 pM, inferior a aproximadamente 80 pM, inferior a aproximadamente 70 pM, inferior a aproximadamente 60 pM, inferior a aproximadamente 50 pM, inferior a aproximadamente 40 pM, inferior a aproximadamente 30 pM, inferior a aproximadamente 20 pM o inferior a aproximadamente 10 pM, medida en un bioensayo de bloqueo basado en células, por ejemplo, usando el formato de ensayo que se define en el Ejemplo 5 del presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

La inhibición de la desgranulación inducida por IL-33 de los basófilos humanos significa que un anticuerpo anti-IL-33 o un fragmento de unión al antígeno del mismo inhibe o reduce la extensión de la desgranulación de basófilos inducida por IL-33 *in vitro*, por ejemplo, medida usando el sistema de ensayo del Ejemplo 7 o un ensayo sustancialmente similar. Por ejemplo, los anticuerpos y sus fragmentos de unión al antígeno pueden inhibir la desgranulación de basófilos humanos en presencia de IL-33 humana (por ejemplo, una concentración final de aproximadamente 100 pM), con una CI_{50} inferior a aproximadamente 500 pM, inferior a aproximadamente 400 pM, inferior a aproximadamente 350 pM, inferior a aproximadamente 300 pM, inferior a aproximadamente 250 pM, inferior a aproximadamente 200 pM, inferior a aproximadamente 150 pM, inferior a aproximadamente 100 pM, inferior a aproximadamente 90 pM, inferior a aproximadamente 80 pM, inferior a aproximadamente 70 pM, inferior a aproximadamente 60 pM, inferior a aproximadamente 50 pM, inferior a aproximadamente 40 pM, inferior a aproximadamente 30 pM, inferior a aproximadamente 20 pM o inferior a aproximadamente 10 pM, medida en un ensayo de desgranulación de basófilos humanos *in vitro*, por ejemplo, usando el formato de ensayo que se define en el Ejemplo 7 del presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

La inhibición de la producción de $IFN\gamma$ inducida por IL-33 a partir de PBMC humanas significa que un anticuerpo anti-IL-33 o fragmento de unión al antígeno del mismo inhibe o reduce la cantidad de $IFN\gamma$ liberada de las PBMC tratadas con IL-33 humana en presencia de IL-12 humana, por ejemplo, medida usando el sistema de ensayo del Ejemplo 8 o un ensayo sustancialmente similar. Por ejemplo, los anticuerpos y sus fragmentos de unión al antígeno pueden inhibir la liberación de $IFN\gamma$ inducida por IL-33, en presencia de IL-12 humana, con una CI_{50} inferior a aproximadamente 50 μ M, inferior a aproximadamente 25 nM, inferior a aproximadamente 20 nM, inferior a aproximadamente 15 nM, inferior a aproximadamente 10 nM, inferior a aproximadamente 5 nM, inferior a aproximadamente 1 nM, inferior a aproximadamente 900 pM, inferior a aproximadamente 800 pM, inferior a aproximadamente 700 pM, inferior a aproximadamente 600 pM, inferior a aproximadamente 500 pM, inferior a aproximadamente 400 pM o inferior a aproximadamente 300 pM, medida en un ensayo de liberación de $IFN\gamma$ inducido por IL-33, por ejemplo, usando el formato de ensayo que se define en el Ejemplo 8 del presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

en determinados casos, los anticuerpos anti-IL-33 y los fragmentos de unión al antígeno bloquean la unión de IL-33 a un receptor de IL-33 (por ejemplo, ST2). Por ejemplo, los anticuerpos anti-IL-33 pueden bloquear la unión de IL-33 a ST2 *in vitro*, con un valor de CI_{50} inferior a aproximadamente 15 nM, medido mediante un inmunoensayo basado en ELISA, por ejemplo, usando el formato de ensayo que se define en el Ejemplo 4 del presente documento, o un ensayo sustancialmente similar. en determinados casos, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden bloquear la unión de IL-33 a ST2 *in vitro* con un valor de CI_{50} inferior a aproximadamente 10 nM, inferior a aproximadamente 5 nM, inferior a aproximadamente 900 pM, inferior a aproximadamente 800 pM, inferior a aproximadamente 700 pM, inferior a aproximadamente 600 pM, inferior a aproximadamente 500 pM, inferior a aproximadamente 400 pM, inferior a aproximadamente 300 pM, inferior a aproximadamente 280 pM, inferior a aproximadamente 260 pM, inferior a aproximadamente 250 pM, inferior a aproximadamente 240 pM, inferior a aproximadamente 230 pM, inferior a aproximadamente 220 pM, inferior a aproximadamente 200 pM, inferior a aproximadamente 180 pM, inferior a aproximadamente 160 pM o inferior a aproximadamente 150 pM, medido mediante un inmunoensayo basado en ELISA, por ejemplo, usando el formato de ensayo que se define en el Ejemplo 4 del presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

En otros casos, sin embargo, ciertos anticuerpos anti-IL-33 y fragmentos de unión al antígeno, a pesar de tener la capacidad de inhibir o atenuar la señalización mediada por IL-33, no bloquean o bloquean solo parcialmente la interacción de IL-33 y ST2. Dichos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, en el presente documento, pueden denominarse "bloqueadores indirectos". Sin quedar ligados a ninguna teoría, se cree que los bloqueadores indirectos funcionan uniéndose a IL-33 en un epítipo que se superpone, o se superpone solo parcialmente, con el dominio de unión a ST2 de IL-33, pero, sin embargo, interfieren con la señalización mediada por IL-33 sin bloquear directamente la interacción de IL-33/ST2.

La presente divulgación incluye anticuerpos anti-IL-33 y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen a moléculas de IL-33 solubles con alta afinidad. Por ejemplo, la presente divulgación incluye anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen a antígenos que se unen a IL-33 (por ejemplo, a 25 °C o 37 °C) con una K_D inferior a aproximadamente 10 nM, medida por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 3 del presente documento. en determinados casos, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden unirse a IL-33 con una K_D inferior a aproximadamente 5 nM, inferior a aproximadamente 2 nM, inferior a aproximadamente 1 nM, inferior a aproximadamente 800 pM, inferior a aproximadamente 600 pM, inferior a aproximadamente 500 pM, inferior a aproximadamente 400 pM, inferior a aproximadamente 300 pM, inferior

a aproximadamente 200 pM, inferior a aproximadamente 180 pM o inferior a aproximadamente 160 pM, tal como se mide mediante resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, usando el formato de ensayo que se define en el Ejemplo 3 del presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

La presente divulgación también incluye anticuerpos anti-IL-33 y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen específicamente a IL-33 con una semivida disociativa ($t_{1/2}$) superior a aproximadamente 10 minutos, medida por resonancia de plasmón superficial a 25 °C o 37 °C, por ejemplo, usando el formato de ensayo que se define en el Ejemplo 3 del presente documento, o un ensayo sustancialmente similar. En determinados casos, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden unirse a IL-33 con una $t_{1/2}$ superior a aproximadamente 20 minutos, superior a aproximadamente el 30 minutos, superior a aproximadamente el 40 minutos, superior a aproximadamente el 50 minutos, superior a aproximadamente el 60 minutos, superior a aproximadamente el 70 minutos, superior a aproximadamente el 80 minutos, superior a aproximadamente el 90 minutos, superior a aproximadamente el 100 minutos, medida por resonancia de plasmón superficial a 25 °C o 37 °C, por ejemplo, usando el formato de ensayo que se define en el Ejemplo 3 del presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

Los anticuerpos de la presente invención pueden poseer una o más de las características biológicas mencionadas anteriormente o cualquiera de sus combinaciones. Otras características biológicas de los anticuerpos de la presente invención serán evidentes para un experto habitual en la materia a partir de una revisión de la presente divulgación, incluidos los ejemplos de trabajo del presente documento.

Anticuerpos anti-IL-33 que comprenden variantes de Fc

Los anticuerpos anti-IL-33 pueden comprender un dominio Fc que comprende una o más mutaciones que aumentan o disminuyen la unión del anticuerpo al receptor FcRn, por ejemplo, a pH ácido en comparación con pH neutro. Por ejemplo, los anticuerpos anti-IL-33 pueden comprender una mutación en la región C_{H2} o C_{H3} del dominio Fc, en donde la/s mutación/es aumentan la afinidad del dominio Fc hacia FcRn en un entorno ácido (por ejemplo, en un endosoma donde el pH varía de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0). Dichas mutaciones pueden producir un aumento en la semivida en suero del anticuerpo cuando se administra a un animal. Los ejemplos no limitantes de dichas modificaciones de Fc incluyen, por ejemplo, una modificación en la posición 250 (por ejemplo, E o Q); 250 y 428 (por ejemplo, L o F); 252 (por ejemplo, L/Y/F/W o T), 254 (por ejemplo, S o T) y 256 (por ejemplo, S/R/Q/E/D o T); o una modificación en la posición 428 y/o 433 (por ejemplo, H/L/R/S/P/Q o K) y/o 434 (por ejemplo, H/F o Y); o una modificación en la posición 250 y/o 428; o una modificación en la posición 307 o 308 (por ejemplo, 308F, V308F) y 434. En un caso, la modificación comprende una modificación 428L (por ejemplo, M428L) y 434S (por ejemplo, N434S); una modificación 428L, 259I (por ejemplo, V259I) y 308F (por ejemplo, V308F); una modificación 433K (por ejemplo, H433K) y 434 (por ejemplo, 434Y); una modificación 252, 254 y 256 (por ejemplo, 252Y, 254T y 256E); una modificación de 250Q y 428L (por ejemplo, T250Q y M428L); y una modificación 307 y/o 308 (por ejemplo, 308F o 308P). En otro caso más, la modificación comprende una modificación 265A (por ejemplo, D265A) y/o 297A (por ejemplo, D297A).

Los anticuerpos anti-IL-33 pueden comprender un dominio Fc que comprende uno o más pares o grupos de mutaciones seleccionados del grupo que consiste en: 250Q y 248L (por ejemplo, T250Q y M248L); 252Y, 254T y 256E (por ejemplo, M252Y, S254T y T256E); 428L y 434S (por ejemplo, M428L y N434S); y 433K y 434F (por ejemplo, H433K y N434F). Todas las combinaciones posibles de las mutaciones del dominio Fc anteriores y otras mutaciones dentro de los dominios variables de anticuerpos desvelados en el presente documento, se contemplan dentro del alcance de la presente divulgación.

La presente divulgación también incluye anticuerpos anti-IL-33 que comprenden una región constante de cadena pesada (C_H) quimérica, en donde la región C_H quimérica comprende segmentos derivados de las regiones C_H de más de un isotipo de inmunoglobulina. Por ejemplo, los anticuerpos pueden comprender una región C_H quimérica que comprende parte o la totalidad de un dominio C_{H2} derivado de una molécula de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana, combinado con parte o la totalidad de un dominio C_{H3} derivado de una molécula de IgG1 humana, de IgG2 humana o de IgG4 humana. De acuerdo con determinados casos, los anticuerpos pueden comprender una región C_H quimérica que tiene una región bisagra quimérica. Por ejemplo, una bisagra quimérica puede comprender una secuencia de aminoácidos de la "bisagra superior" (restos de aminoácidos de las posiciones 216 a 227 de acuerdo con la numeración de la UE) derivada de una región bisagra de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana, combinada con una secuencia de "bisagra inferior" (restos de aminoácidos de las posiciones 228 a 236 de acuerdo con la numeración de la UE) derivada de una región bisagra de IgG1 humana, una región bisagra de IgG2 humana o una región bisagra de IgG4 humana. De acuerdo con determinados casos, la región bisagra quimérica comprende restos de aminoácidos derivados de una bisagra superior de IgG1 humana o IgG4 humana y de restos de aminoácidos derivados de una bisagra inferior de IgG2 humana. Un anticuerpo que comprende una región C_H quimérica como se describe en el presente documento puede, en determinados casos, presentar funciones efectoras de Fc modificadas sin afectar negativamente a las propiedades terapéuticas o farmacocinéticas del anticuerpo. (Véase, por ejemplo, el documento WO2014/121087, que reivindica el derecho de prioridad de la solicitud provisional de EE. UU. n.º 61/759578, presentada el 1 de febrero de 2013).

Cartografía de epítomos y tecnologías relacionadas

La presente divulgación incluye anticuerpos anti-IL-33 que interactúan con uno o más aminoácidos de IL-33. Por ejemplo, la presente divulgación incluye anticuerpos anti-IL-33 que interactúan con uno o más aminoácidos ubicados dentro del dominio de IL-33 que interactúa con ST2. El epítipo al que se unen los anticuerpos puede consistir en una sola secuencia contigua de 3 o más (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más) aminoácidos de IL-33. Como alternativa, el epítipo puede consistir en una pluralidad de aminoácidos no contiguos (o secuencias de aminoácidos) de IL-33.

Pueden usarse distintas técnicas conocidas para los expertos en la materia para determinar si un anticuerpo "interacciona con uno o más aminoácidos" dentro de un polipéptido o de una proteína. Las técnicas ilustrativas incluyen, por ejemplo, ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en "Antibodies", Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), análisis mutacional de barrido con alanina, análisis de transferencias de péptidos (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463) y análisis de escisión de péptidos. Además, pueden emplearse métodos tales como escisión de epítipos, extracción de epítipos y modificación química de antígenos (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Otro método que puede usarse para identificar los aminoácidos dentro de un polipéptido con el que interacciona un anticuerpo es el intercambio de hidrógeno/deuterio detectado por espectrometría de masas. En términos generales, el método de intercambio hidrógeno/deuterio implica el marcaje con deuterio de la proteína de interés, seguido de la unión del anticuerpo a la proteína marcada con deuterio. A continuación, el complejo de proteína/anticuerpo se transfiere a agua para permitir que tenga lugar el intercambio de hidrógeno-deuterio en todos los restos excepto los restos protegidos por el anticuerpo (que permanecen marcados con deuterio). Después de la disociación del anticuerpo, la proteína diana se somete a escisión por proteasa y análisis de espectrometría de masas, revelando de esta manera los restos marcados con deuterio que corresponden a los aminoácidos específicos con los que interacciona el anticuerpo. Véase, por ejemplo, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen y Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

La presente divulgación incluye además anticuerpos anti-IL-33 que se unen al mismo epítipo que cualquiera de los anticuerpos ilustrativos específicos descritos en el presente documento (por ejemplo, H1M9559N, H1M9566N, H1M9568N, H4H9629P, H4H9633P, H4H9640P, H4H9659P, H4H9660P, H4H9662P, H4H9663P, H4H9664P, H4H9665P, H4H9666P, H4H9667P, H4H9670P, H4H9671P, H4H9672P, H4H9675P, H4H9676P, H1M9565N, etc.). De manera análoga, la presente divulgación también incluye anticuerpos anti-IL-33 que compiten por unirse a IL-33 con cualquiera de los anticuerpos ilustrativos específicos descritos en el presente documento (por ejemplo, H1M9559N, H1M9566N, H1M9568N, H4H9629P, H4H9633P, H4H9640P, H4H9659P, H4H9660P, H4H9662P, H4H9663P, H4H9664P, H4H9665P, H4H9666P, H4H9667P, H4H9670P, H4H9671P, H4H9672P, H4H9675P, H4H9676P, H1M9565N, etc.).

Se puede determinar fácilmente si un anticuerpo se une al mismo epítipo que, o compite por la unión con, un anticuerpo anti-IL-33 de referencia mediante el uso de métodos de rutina conocidos en la técnica e ilustrados en el presente documento. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo de prueba se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-IL-33 de referencia, se permite que el anticuerpo de referencia se una a una proteína IL-33. A continuación, se evalúa la capacidad de un anticuerpo de prueba para unirse a la molécula de IL-33. Si el anticuerpo de prueba puede unirse a IL-33 tras la unión por saturación con el anticuerpo anti-IL-33 de referencia, puede concluirse que el anticuerpo de prueba se une a un epítipo diferente del anticuerpo anti-IL-33 de referencia. Por otro lado, si el anticuerpo de prueba no puede unirse a la molécula de IL-33 tras la unión por saturación con el anticuerpo anti-IL-33 de referencia, entonces el anticuerpo de prueba puede unirse al mismo epítipo que el epítipo al que se une el anticuerpo anti-IL-33 de referencia. Se puede llevar a cabo experimentación habitual adicional (por ejemplo, mutación de péptidos y análisis de unión) para confirmar si la ausencia observada de unión del anticuerpo de prueba se debe, de hecho, a la unión al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia o si el bloqueo estérico (u otro fenómeno) es responsable de la ausencia de la unión observada. Los experimentos de este tipo pueden realizarse usando ELISA, RIA, Biacore, citometría de flujo o cualquier otro ensayo cuantitativo o cualitativo de unión de anticuerpos disponible en la técnica. Según ciertos casos de la presente divulgación, dos anticuerpos se unen al mismo epítipo (o a epítipos solapantes) si, por ejemplo, un exceso en un factor de 1, 5, 10, 20 o 100 de un anticuerpo inhibe la unión del otro en al menos un 50 %, pero preferentemente en un 75 %, 90 % o incluso un 99 %, medida en un ensayo de unión competitiva (véase, por ejemplo, Junghans *et al.*, *Cancer Res.* 1990:50:1495-1502). Como alternativa, se considera que dos anticuerpos se unen al mismo epítipo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácido en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro. Se considera que dos anticuerpos tienen "epítipos solapantes" si únicamente un subconjunto de las mutaciones de aminoácido que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro.

Para determinar si un anticuerpo compite por la unión (o compite de forma cruzada por la unión) con un anticuerpo anti-IL-33 de referencia, se realiza la metodología de unión descrita anteriormente en dos orientaciones: En una primera orientación, se permite que el anticuerpo de referencia se una a una proteína IL-33 en condiciones de saturación, seguido de la evaluación de la unión del anticuerpo de prueba a la molécula IL-33. En una segunda orientación, se permite que el anticuerpo de prueba se una a una molécula de IL-33 en condiciones de saturación seguido de la evaluación de la unión del anticuerpo de referencia a la molécula de IL-33. Si, en ambas orientaciones, únicamente el primer anticuerpo (de saturación) puede unirse a la molécula de IL-33, entonces se concluye que el anticuerpo de prueba y el anticuerpo de referencia compiten por la unión a IL-33. Como apreciará un experto en la

materia, es posible que un anticuerpo que compite por la unión con un anticuerpo de referencia no se una necesariamente al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia, sino que puede bloquear estéricamente la unión del anticuerpo de referencia mediante la unión a un epítipo solapante o adyacente.

5 Preparación de anticuerpos humanos

Los métodos para generar anticuerpos monoclonales, incluyendo anticuerpos monoclonales completamente humanos son conocidos en la técnica. Cualquiera de dichos métodos conocidos puede usarse en el contexto de la presente invención para preparar anticuerpos humanos que se unan específicamente a IL-33 humano.

Usando la tecnología VELOCIMMUNE™, por ejemplo, o cualquier otro método conocido para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos, inicialmente, se aíslan anticuerpos quiméricos de alta afinidad contra IL-33 que tienen una región variable humana y una región constante de ratón. Como en la siguiente sección experimental, los anticuerpos se caracterizan y seleccionan para las características deseables, entre las que se incluyen la afinidad, selectividad, epítipo, etc. Si es necesario, las regiones constantes del ratón se reemplazan con una región constante humana deseada, por ejemplo, IgG1 o IgG4 de tipo silvestre o modificado, para generar un anticuerpo anti-IL-33 completamente humano. Aunque la región constante seleccionada puede variar de acuerdo con el uso específico, las características de unión al antígeno de alta afinidad y especificidad de diana residen en la región variable. en determinados casos, los anticuerpos anti-IL-33 completamente humanos se aíslan directamente de los linfocitos B positivos en el antígeno.

Bioequivalentes

Los anticuerpos anti-IL-33 y los fragmentos de anticuerpos de la presente divulgación abarcan proteínas que tienen secuencias de aminoácidos que varían de las de los anticuerpos descritos, pero que retienen la capacidad de unirse a la IL-33 humana. Dichas variantes de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo comprenden una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos cuando se comparan con la secuencia precursora, pero muestran actividad biológica que es esencialmente equivalente a la de los anticuerpos descritos. De manera análoga, las secuencias de ADN que codifican el anticuerpo anti-IL-33 de la presente divulgación abarcan secuencias que comprenden una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de nucleótidos en comparación con la secuencia desvelada, pero que codifican un anticuerpo anti-IL-33 o fragmento de anticuerpo que es esencialmente bioequivalente a un anticuerpo anti-IL-33 o fragmento de anticuerpo de la divulgación. Anteriormente, se han analizado ejemplos de dichas variantes de secuencias de aminoácidos y ADN.

Dos proteínas de unión al antígeno, o anticuerpos, se consideran bioequivalentes si, por ejemplo, son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuya tasa y grado de absorción no muestran una diferencia significativa cuando se administran a la misma dosis molar en condiciones experimentales similares, en una sola dosis o en múltiples dosis. Algunos anticuerpos se considerarán equivalentes o alternativas farmacéuticas si son equivalentes en el grado de su absorción, pero no en su tasa de absorción y aún pueden considerarse bioequivalentes porque dichas diferencias en la tasa de absorción son intencionadas y se reflejan en el marcaje, no son esenciales para obtener las concentraciones eficaces del fármaco en el organismo en, por ejemplo, el uso crónico, y se consideran médicamente insignificantes para el producto farmacológico particular estudiado.

En un caso, dos proteínas de unión al antígeno son bioequivalentes si no hay diferencias clínicamente importantes en su seguridad, pureza y potencia.

En un caso, dos proteínas de unión al antígeno son bioequivalentes si un paciente puede cambiarse una o más veces entre el producto de referencia y el producto biológico sin un aumento esperado en el riesgo de efectos adversos, incluyendo un cambio clínicamente significativo en la inmunogenicidad, o eficacia disminuida, en comparación con la terapia continuada sin dicho cambio.

En un caso, dos proteínas de unión al antígeno son bioequivalentes si ambas actúan por un mecanismo o mecanismos comunes de acción para la afección o afecciones de uso, en la medida en que dichos mecanismos sean conocidos.

La bioequivalencia puede demostrarse por métodos *in vivo* e *in vitro*. Las medidas de bioequivalencia incluyen, por ejemplo, (a) un ensayo *in vivo* en seres humanos u otros mamíferos, en los que se mide la concentración del anticuerpo o sus metabolitos en sangre, plasma, suero u otro líquido biológico como una función del tiempo; (b) un ensayo *in vitro* que se ha correlacionado con y es razonablemente predictivo de datos de biodisponibilidad *in vivo* en seres humanos; (c) un ensayo *in vivo* en seres humanos u otros mamíferos en el que se mide el efecto farmacológico agudo apropiado del anticuerpo (o su diana) como una función del tiempo; y (d) en un ensayo clínico bien controlado que establece la seguridad, eficacia o biodisponibilidad o bioequivalencia de un anticuerpo.

Las variantes bioequivalentes de los anticuerpos anti-IL-33 pueden construirse mediante, por ejemplo, la generación de diversas sustituciones de restos o secuencias, o la eliminación de restos terminales o internos o secuencias no necesarias para la actividad biológica. Por ejemplo, pueden eliminarse restos de cisteína no esenciales para la actividad biológica, o remplazarse con otros aminoácidos, para evitar la formación de puentes disulfuro

intramoleculares innecesarios o incorrectos tras la renaturalización. En otros contextos, los anticuerpos bioequivalentes pueden incluir variantes de anticuerpo anti-IL-33 que comprenden cambios de aminoácido que modifican las características de glucosilación de los anticuerpos, por ejemplo, mutaciones que eliminan o retiran la glucosilación.

5

Selectividad de especie y reactividad cruzada de especie

La presente divulgación, de acuerdo con determinados casos, proporciona anticuerpos anti-IL-33 que se unen a la IL-33 humana, pero no a la IL-33 de otras especies. La presente divulgación también incluye anticuerpos anti-IL-33 que se unen a la IL-33 humana y a la IL-33 de una o más especies no humanas. Por ejemplo, los anticuerpos anti-IL-33 de la divulgación pueden unirse a la IL-33 humana y pueden unirse o no unirse, según sea el caso, a una o más IL-33 de ratón, rata, cobaya, hámster, jerbo, cerdo, gato, perro, conejo, cabra, oveja, vaca, caballo, camello, macaco cangrejero, tití, macaco de la India o chimpancé. De acuerdo con ciertas realizaciones ilustrativas de la presente invención, se proporcionan anticuerpos anti-IL-33 que se unen específicamente a la IL-33 humana y a la IL-33 de macaco cangrejero (por ejemplo, *Macaca fascicularis*).

15

Inmunoconjugados

La invención abarca anticuerpos monoclonales anti-IL-33 conjugados con una fracción terapéutica ("inmunoconjugado"), tal como una citotoxina, un fármaco quimioterapéutico, un inmunodepresor o un radioisótopo. Los agentes citotóxicos incluyen cualquier agente que sea perjudicial para las células. En la técnica se conocen ejemplos de agentes citotóxicos y agentes quimioterapéuticos adecuados para formar inmunoconjugados, (véase, por ejemplo, el documento WO 05/103081).

20

Anticuerpos multiespecíficos

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser monoespecíficos, biespecíficos o multiespecíficos. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de un polipéptido diana o pueden contener dominios de unión al antígeno específicos para más de un polipéptido diana. Véase, por ejemplo, Tutt *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 147: 60-69; Kufer *et al.*, 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244. Los anticuerpos anti-IL-33 de la presente invención pueden unirse a o expresarse junto con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo puede unirse de forma funcional (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares diferentes, tal como otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo para producir un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico con una segunda especificidad de unión. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos biespecíficos en donde un brazo de una inmunoglobulina es específico para IL-33 humana o un fragmento de la misma, y el otro brazo de la inmunoglobulina es específico para una segunda diana terapéutica o está conjugado con una fracción terapéutica.

30

35

Un formato de anticuerpo biespecífico ilustrativo que puede usarse en el contexto de la presente invención implica el uso de un primer dominio C_H3 de inmunoglobulina (Ig) y un segundo dominio C_H3 de Ig, en donde el primer y el segundo dominio C_H3 de Ig difieren entre sí en al menos un aminoácido, y en donde al menos una diferencia de aminoácido reduce la unión del anticuerpo biespecífico con la proteína A en comparación con un anticuerpo biespecífico que carece de la diferencia de aminoácido. En una realización, el primer dominio C_H3 de Ig está unido a la proteína A y el segundo dominio C_H3 de Ig contiene una mutación que reduce o anula la unión a la proteína A tal como una modificación H95R (por numeración de exones IMGT; H435R por numeración EU). El segundo C_H3 puede comprender además una modificación Y96F (por IMGT; Y436F por EU). Otras modificaciones adicionales que pueden encontrarse dentro del segundo C_H3 incluyen: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M y V82I (por IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M y V422I por EU) en el caso de anticuerpos IgG1; N44S, K52N y V82I (IMGT; N384S, K392N y V422I por EU) en el caso de anticuerpos IgG2; y Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q y V82I (por IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q y V422I por EU) en el caso de anticuerpos IgG4. Dentro del alcance de la presente invención se contemplan variaciones en el formato de anticuerpo biespecífico descrito anteriormente.

40

45

50

Otros formatos biespecíficos ilustrativos que pueden usarse en el contexto de la presente invención incluyen, sin limitación, por ejemplo, formatos biespecíficos basados en scFv o de diacuerpo, fusiones IgG-scFv, dominio variable doble (DVD)-Ig, cuadroma, botón en ojal, cadena ligera habitual (por ejemplo, cadena ligera habitual con botón en ojal, etc.), CrossMab, CrossFab, (SEED)cuerpo, cremallera de leucina, duocuerpo, IgG1/IgG2, Fab de acción doble (DAF, *dual acting Fab*)-IgG y formatos biespecíficos de Mab² (véase, por ejemplo, Klein *et al.*, 2012, mAbs4:6,1-11, y referencias citadas en el mismo, para una revisión de los formatos anteriores). También se pueden construir anticuerpos biespecíficos usando conjugación de péptido/ácido nucleico, por ejemplo, en donde se usan aminoácidos no naturales con reactividad química ortogonal para generar conjugados de anticuerpo-oligonucleótido específicos de sitio que después se autoensamblan en complejos multiméricos con composición, valencia y geometría definidas. (Véanse, por ejemplo, Kazane *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* [Epub: 4 de diciembre de 2012]).

60

UNIÓN DEPENDIENTE DEL pH

65

Los anticuerpos y sus fragmentos de unión al antígeno pueden unirse a IL-33 de una manera dependiente del pH. Por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-33 puede presentar una unión reducida a IL-33 a pH ácido en comparación con el pH neutro. Como alternativa, un anticuerpo anti-IL-33 puede presentar una unión mejorada a su antígeno a pH ácido en comparación con el pH neutro.

en determinados casos, "unión reducida a IL-33 a pH ácido en comparación con el pH neutro" se expresa en términos de una proporción del valor de K_D del anticuerpo que se une a IL-33 a pH ácido con respecto al valor de K_D del anticuerpo que se une a IL-33 a pH neutro (o viceversa). Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede considerarse que presenta "unión reducida a IL-33 a pH ácido en comparación con pH neutro" si el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo presenta una proporción de K_D ácida/neutra de aproximadamente 3,0 o superior. en determinados casos ilustrativos, la proporción de K_D ácida/neutra para un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede ser de aproximadamente 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 o superior.

Se pueden obtener anticuerpos con características de unión dependientes del pH, por ejemplo, rastreando una población de anticuerpos en busca de la reducción (o potenciación) de la unión a un determinado antígeno a pH ácido en comparación con el pH neutro. Además, las modificaciones del dominio de unión al antígeno a nivel de aminoácidos pueden producir anticuerpos con características dependientes del pH. Por ejemplo, mediante la sustitución de uno o más aminoácidos de un dominio de unión al antígeno [por ejemplo, dentro de una CDR) con un resto de histidina, puede obtenerse un anticuerpo con unión al antígeno reducida a pH ácido en relación con el pH neutro. Como se usa en el presente documento, la expresión "pH ácido" significa un pH de aproximadamente 6,0 o inferior, aproximadamente 5,5 o inferior, o aproximadamente 5,0 o inferior. La expresión "pH ácido" incluye valores de pH de aproximadamente 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 o inferior. Como se usa en el presente documento, la expresión "pH neutro" significa un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,4. La expresión "pH neutro" incluye valores de pH de aproximadamente 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 y 7,4.

Formulación terapéutica y administración

La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos anti-IL-33 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan con vehículos, excipientes y otros agentes adecuados que proporcionan una transferencia, administración, tolerancia y similares mejoradas. Puede encontrarse una multitud de formulaciones apropiadas en el formulario conocido para todos los químicos farmacéuticos: "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, gelatinas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tales como LIPOFECTIN™), Life Technologies, Carlsbad, CA), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y agua en aceite, emulsiones de Carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen Carbowax. Véase también Powell *et al.*, "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) *J Pharm Sci Technol* 52:238-311.

La dosis de anticuerpo administrada a un paciente puede variar dependiendo de la edad y las dimensiones del paciente, la enfermedad diana, afecciones, la vía de administración y similares. La dosis preferida se calcula normalmente de acuerdo con el peso corporal o el área superficial del cuerpo. Cuando un anticuerpo se usa para tratar una afección o enfermedad asociada con la actividad IL-33 en un paciente adulto, puede ser ventajoso administrar por vía intravenosa el anticuerpo, normalmente en una única dosis de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, más preferentemente, de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 7, de aproximadamente 0,03 a aproximadamente 5 o de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal. Dependiendo de la gravedad de la afección, pueden ajustarse la frecuencia y la duración del tratamiento. Las dosis y posologías eficaces para administrar anticuerpos anti-IL-33 pueden determinarse empíricamente; por ejemplo, puede controlarse el progreso del paciente mediante la evaluación periódica, y ajustarse correspondientemente la dosis. Por otra parte, pueden realizarse aumentos de escala de las dosis entre especies usando métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Mordenti *et al.*, 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar la composición farmacéutica de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Los métodos de introducción incluyen, pero sin limitación, la vía intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y otras vías. La composición puede administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

Una composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse por vía subcutánea o por vía intravenosa con una aguja y una jeringa convencionales. Además, con respecto a la administración subcutánea, un dispositivo

inyector de pluma tiene fácilmente aplicaciones en la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. Dicho dispositivo inyector de pluma puede ser reutilizable o desechable. Un dispositivo inyector de pluma reutilizable usa, en general, un cartucho reemplazable que contiene una composición farmacéutica. Una vez que se ha administrado toda la composición farmacéutica dentro del cartucho y que el cartucho está vacío, el cartucho vacío puede desecharse fácilmente y remplazarse con un nuevo cartucho que contiene la composición farmacéutica. El dispositivo inyector de pluma puede entonces reutilizarse. En un dispositivo inyector de pluma desechable, no hay cartucho reemplazable. Más bien, el dispositivo inyector de pluma desechable viene precargado con la composición farmacéutica mantenida en un depósito dentro del dispositivo. Una vez que el depósito se vacía de la composición farmacéutica, el dispositivo completo se desecha.

Numerosos dispositivos de administración de pluma y autoinyector reutilizables tienen aplicaciones en la administración subcutánea de una composición farmacéutica de la presente invención. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitación, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, RU), DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Suiza), pluma HUMALOG MIX 75/25™, pluma HUMALOG™, pluma HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly y Co., Indianápolis, IN), NOVOPEN™ I, II y III (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), pluma BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ y OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Alemania), por nombrar solo algunos. Los ejemplos de dispositivos de administración de pluma desechables que tienen aplicaciones en la administración subcutánea de una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, aunque sin limitación, la pluma SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), el FLEXPEN™ (Novo Nordisk) y el KWIKPEN™ (Eli Lilly), el autoinyector SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), el PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Alemania), el EPIPEN (Dey, L.P.), y la pluma HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), por nombrar solo algunos.

En determinadas situaciones, la composición farmacéutica puede suministrarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, puede usarse una bomba (véase Langer, anteriormente citado; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. *Biomed. Eng.* 14:201). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos; véase, "Medical Applications of Controlled Release", Langer y Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Ratón, Florida. En otra realización más, un sistema de liberación controlada puede ubicarse en las proximidades de la diana de la composición, siendo necesaria, por tanto, solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, 1984, en "Medical Applications of Controlled Release", mencionado anteriormente, vol. 2, pág. 115-138). Se analizan otros sistemas de liberación controlada en la revisión de Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533.

Las preparaciones inyectables pueden incluir formas farmacéuticas para la vía intravenosa, subcutánea, inyecciones intracutáneas e intramusculares, infusiones por goteo, etc. Estas preparaciones inyectables pueden prepararse mediante métodos conocidos para el público. Por ejemplo, las preparaciones inyectables pueden prepararse, por ejemplo, disolviendo, suspendiendo o emulsionando el anticuerpo o su sal descrita anteriormente en un medio acuoso estéril o un medio oleoso usado convencionalmente para inyecciones. Como medio acuoso para inyecciones, existen, por ejemplo, solución salina fisiológica, una solución isotónica que contiene glucosa y otros coadyuvantes, etc., que pueden usarse en combinación con un agente solubilizante apropiado tal como un alcohol (por ejemplo, etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), un tensioactivo no iónico [por ejemplo, polisorbato 80, HCO-50 (aducto de polioxitileno (50 mol) de aceite de ricino hidrogenado)], etc. Como el medio oleoso, se emplean, por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de soja, etc., que pueden usarse en combinación con un agente solubilizante tal como benzoato de bencilo, alcohol bencilico, etc. La inyección preparada de este modo se carga preferentemente en una ampolla apropiada.

Provechosamente, las composiciones farmacéuticas para uso oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en formas farmacéuticas en una dosis unitaria adecuada para ajustarse a una dosis de los principios activos. Dichas formas farmacéuticas en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc. La cantidad del anticuerpo mencionado anteriormente contenida generalmente es de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 mg por forma farmacéutica en una dosis unitaria; especialmente en forma de inyección, se prefiere que el anticuerpo mencionado anteriormente esté contenido en aproximadamente 5 a aproximadamente 100 mg y en aproximadamente 10 a aproximadamente 250 mg para las otras formas farmacéuticas.

Usos terapéuticos de los anticuerpos

Experimentos usando sistemas de modelos de ratón, realizados por los presentes inventores, han contribuido a la identificación de distintas enfermedades y afecciones que pueden tratarse, prevenirse y/o mejorarse mediante el antagonismo de IL-33. Por ejemplo, la administración hidrodinámica de ADN de IL-33 de ratón produjo la inducción de la acumulación de moco pulmonar y aumentos en la IgE sérica total en ratones. Además, la administración de ADN de mIL-33 produjo una regulación positiva de ST2 y de distintas citocinas en dirección 3', medida mediante el análisis de micromatrices. Los experimentos realizados por los presentes inventores usando ratones con desactivación de IL-33 también desvelaron distintos posibles beneficios terapéuticos del antagonismo de IL-33. Por ejemplo, se encontró que la puntuación macroscópica y los infiltrados de la piel son comparables entre ratones de tipo silvestre y ratones IL-33^{-/-} en un modelo de psoriasis inducida por IMQ. Por otra parte, los ratones IL-33^{-/-} mostraron eosinofilia reducida y acumulación de moco residual en un modelo de inflamación pulmonar inducida por alérgenos.

Los anticuerpos de la divulgación son útiles, entre otros, para el tratamiento, la prevención y/o la mejora de cualquier enfermedad o trastorno asociado con o mediado por la expresión, señalización o actividad de IL-33, o que se puede tratar bloqueando la interacción entre IL-33 y un ligando de IL-33 (por ejemplo, ST2) o inhibiendo de otro modo la actividad y/o señalización de IL-33. Por ejemplo, la presente divulgación proporciona métodos de tratamiento del asma (por ejemplo, asma alérgica, asma no alérgica, asma refractaria grave, agravamientos del asma, asma resistente a los esteroides, asma sensible a esteroides, asma eosinofílica o asma no eosinofílica, etc.), dermatitis atópica, psoriasis, otros trastornos inflamatorios, alergia, anafilaxia, enfermedad cardiovascular, enfermedad del sistema nervioso central, dolor, artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, artrosis, artritis psoriásica, etc.), arteritis de células gigantes, vasculitis (enfermedad de Behcet y síndrome de Churg Strauss), púrpura de Henoch-Schonlein, esclerosis múltiple, trastorno inflamatorio intestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa), lupus y síndrome de Sjögren. En la invención, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo se usa en un método de tratamiento del asma crónica o la EPOC.

Los anticuerpos de la presente divulgación también son útiles para el tratamiento, la prevención y/o la mejora de una o más enfermedades fibróticas. Las enfermedades fibróticas ilustrativas que se pueden tratar mediante la administración de los anticuerpos anti-IL-33 de la divulgación incluyen fibrosis pulmonar (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, fibrosis pulmonar inducida por el asbesto y síndrome de bronquiolitis obliterante), asma crónica, fibrosis asociada con lesión pulmonar aguda y dificultad respiratoria aguda (por ejemplo, fibrosis bacteriana inducida por neumonía, fibrosis inducida por traumatismo, fibrosis inducida por neumonía vírica, fibrosis inducida por ventilación artificial, fibrosis inducida por sepsis no pulmonar y fibrosis inducida por aspiración), silicosis, fibrosis inducida por radiación, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC, que puede o no estar relacionada con, causada en parte por, o deberse a, la exposición al humo del tabaco directa o indirectamente), esclerodermia, fibrosis ocular, fibrosis de la piel (por ejemplo, esclerodermia), fibrosis hepática (por ejemplo, cirrosis, fibrosis hepática inducida por alcohol, esteatohepatitis no alcohólica (ENA), lesión del conducto biliar, cirrosis biliar primaria, fibrosis hepática inducida por infección o virus, hepatitis autoinmunitaria, fibrosis del riñón (renal), fibrosis cardíaca, aterosclerosis, reestenosis de stent y mielofibrosis.

En el contexto de los métodos de tratamiento descritos en el presente documento, el anticuerpo anti-IL-33 puede administrarse como una monoterapia (es decir, como el único agente terapéutico) o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales (cuyos ejemplos se describen en otra parte del presente documento).

Terapias y formulaciones combinadas

La presente divulgación incluye composiciones y formulaciones terapéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-IL-33 descritos en el presente documento en combinación con uno o más componentes terapéuticamente activos adicionales, y métodos de tratamiento que comprenden administrar dichas combinaciones a sujetos que lo necesiten.

Los anticuerpos anti-IL-33 de la presente invención pueden formularse conjuntamente y/o administrarse en combinación con, por ejemplo, inhibidores de las citocinas, incluyendo inhibidores de citocinas de molécula pequeña y anticuerpos que se unen a citocinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, IL-25, IL-26 o antagonistas de sus respectivos receptores.

Los anticuerpos anti-IL-33 de la invención también pueden administrarse y/o formularse conjuntamente en combinación con agentes antivíricos, antibióticos, analgésicos, corticoesteroides, esteroides, oxígeno, antioxidantes, quelantes de metal, IFN-gamma y/o AINE.

El componente o componentes terapéuticamente activos adicionales pueden administrarse justo antes de, simultáneamente o poco después de la administración de un anticuerpo anti-IL-33 de la presente invención; (para los fines de la presente divulgación, dichos regímenes de administración se consideran la administración de un anticuerpo anti-IL-33 "en combinación con" un componente terapéuticamente activo adicional). La presente invención incluye composiciones farmacéuticas en las que un anticuerpo anti-IL-33 de la presente invención se formula conjuntamente con uno o más de los componentes terapéuticamente activos adicionales como se describe en otra parte del presente documento.

Regímenes de administración

De acuerdo con ciertos casos de la presente divulgación, se pueden administrar dosis múltiples de un anticuerpo anti-IL-33 (o una composición farmacéutica que comprende una combinación de un anticuerpo anti-IL-33 y cualquiera de los agentes terapéuticamente activos adicionales mencionados en el presente documento) a un sujeto durante un curso de tiempo definido. Los métodos de acuerdo con este aspecto de la divulgación comprenden administrar secuencialmente a un sujeto dosis múltiples de un anticuerpo anti-IL-33 de la invención. Como se usa en el presente documento, "administrar secuencialmente" significa que cada dosis de anticuerpo anti-IL-33 se administra al sujeto en un diferente punto en el tiempo, por ejemplo, en días diferentes separados por un intervalo predeterminado (por ejemplo, horas, días, semanas o meses). La presente divulgación incluye métodos que comprenden administrar secuencialmente al paciente una sola dosis inicial de un anticuerpo anti-IL-33, seguida por una o más dosis

secundarias del anticuerpo anti-IL-33, y opcionalmente seguidas por una o más dosis terciarias del anticuerpo anti-IL-33.

Las expresiones "dosis inicial", "dosis secundarias", y "dosis terciarias", se refieren a la secuencia temporal de administración del anticuerpo anti-IL-33 de la invención. Por tanto, la "dosis inicial" es la dosis que se administra al inicio del régimen de tratamiento (también mencionada como la "dosis de referencia"); las "dosis secundarias" son las dosis que se administran después de la dosis inicial; y las "dosis terciarias" son las dosis que se administran después de las dosis secundarias. Las dosis iniciales, secundarias y terciarias pueden contener todas la misma cantidad de anticuerpo anti-IL-33, pero, en general, pueden diferir entre sí en términos de frecuencia de administración. en determinados casos, sin embargo, la cantidad de anticuerpo anti-IL-33 contenida en las dosis iniciales, secundarias y/o terciarias varían entre sí (por ejemplo, se ajustan positiva o negativamente según lo apropiado) en el transcurso del tratamiento. en determinados casos, se administran dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4 o 5) dosis al inicio del régimen de tratamiento como "dosis de carga" seguidas por dosis posteriores que se administran con menor frecuencia (por ejemplo, "dosis de mantenimiento").

en determinados casos ilustrativos, cada dosis secundaria y/o terciaria se administra de 1 a 26 (por ejemplo, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ o más) semanas después de la dosis inmediatamente anterior. La expresión "la dosis inmediatamente anterior", como se usa en el presente documento, significa, en una secuencia de administraciones múltiples, la dosis de anticuerpo anti-IL-33 que se administra a un paciente antes de la administración de la siguiente dosis en la secuencia sin dosis intermedias.

Los métodos de acuerdo con este aspecto de la divulgación pueden comprender administrar a un paciente cualquier cantidad de dosis secundarias y/o terciarias de un anticuerpo anti-IL-33. Por ejemplo, en determinados casos, se administra únicamente una sola dosis secundaria al paciente. En otras realizaciones, al paciente se le administra dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) dosis secundarias. De manera análoga, en determinados casos, se administra únicamente una sola dosis terciaria al paciente. En otros casos, al paciente se le administra dos o más (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) dosis terciarias.

En los casos que implican múltiples dosis secundarias, cada dosis secundaria puede administrarse a la misma frecuencia que las otras dosis secundarias. Por ejemplo, cada dosis secundaria puede administrarse al paciente de 1 a 2 semanas o de 1 a 2 meses después de la dosis inmediatamente anterior. De manera similar, en los casos que implican múltiples dosis terciarias, cada dosis terciaria puede administrarse a la misma frecuencia que las otras dosis terciarias. Por ejemplo, cada dosis terciaria puede administrarse al paciente de 2 a 12 semanas después de la dosis inmediatamente anterior. en determinados casos, la frecuencia a la que se administran las dosis secundarias y/o terciarias a un paciente puede variar en el transcurso del régimen de tratamiento. La frecuencia de administración también puede ser ajustada en el transcurso del tratamiento por un médico dependiendo de las necesidades del paciente individual después de examen clínico.

La presente divulgación incluye regímenes de administración en los que se administran de 2 a 6 dosis de carga a una primera frecuencia de paciente (por ejemplo, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses, etc.), seguido de la administración de dos o más dosis de mantenimiento al paciente de forma menos frecuente. Por ejemplo, de acuerdo con este aspecto de la divulgación, si las dosis de carga se administran con una frecuencia de una vez al mes, entonces, las dosis de mantenimiento se pueden administrar al paciente una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, etc.).

Usos de diagnóstico de los anticuerpos

Los anticuerpos anti-IL-33 de la presente divulgación también se pueden usar para detectar y/o medir IL-33, o células que expresan IL-33 en una muestra, por ejemplo, con fines de diagnóstico. Por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-33 o fragmento del mismo, puede usarse para diagnosticar una afección o enfermedad caracterizada por la expresión aberrante (por ejemplo, sobreexpresión, infraexpresión, ausencia de expresión, etc.) de IL-33. Los ensayos de diagnóstico ilustrativos para IL-33 pueden comprender, por ejemplo, poner en contacto una muestra, obtenida de un paciente, con un anticuerpo anti-IL-33 de la divulgación, en donde el anticuerpo anti-IL-33 está marcado con un marcador detectable o molécula indicadora. Como alternativa, puede usarse un anticuerpo anti-IL-33 no marcado en aplicaciones de diagnóstico en combinación con un anticuerpo secundario que está marcado de forma detectable por sí mismo. El marcador detectable o molécula indicadora puede ser un radioisótopo, tal como ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S o ¹²⁵I; una fracción fluorescente o quimioluminiscente tal como isotiocianato de fluoresceína o rodamina; o una enzima tal como una fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, peroxidasa de rábano picante o luciferasa. Los ensayos ilustrativos específicos que pueden usarse para detectar o medir IL-33 en una muestra incluyen el ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), el radioinmunoensayo (RIA) y la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

Las muestras que pueden usarse en ensayos de diagnóstico de IL-33 de acuerdo con la presente divulgación incluyen cualquier muestra de tejido o de fluido que se puede obtener de un paciente que contiene cantidades detectables de proteína IL-33 o fragmentos de la misma, en condiciones normales o patológicas. En general, se medirán los niveles de IL-33 en una muestra particular obtenida de un paciente sano (por ejemplo, un paciente no afectado por una

enfermedad o afección asociada con niveles o actividad de IL-33 anómalos) para establecer un nivel de referencia, o patrón, de IL-33. Este nivel de referencia de IL-33 se puede comparar después con los niveles de IL-33 medidos en muestras obtenidas de individuos sospechosos de tener una enfermedad o afección relacionada con IL-33.

5 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación y descripción completa de cómo preparar y usar los métodos y las composiciones de la invención, y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, sumas, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio, la temperatura está en grados centígrados y la presión es atmosférica o cercana a la atmosférica.

15 Ejemplo 1. Generación de anticuerpos humanos contra la IL-33 humana

Se administró directamente un inmunógeno que comprende IL-33 humana, con un adyuvante para estimular la respuesta inmunitaria, a un ratón VELOCIMMUNE® que comprende ADN que codifica las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana. La respuesta inmunitaria del anticuerpo se controló mediante un inmunoensayo específico de IL-33. Cuando se consiguió una respuesta inmunitaria deseada, se recogieron los esplenocitos y se fusionaron con células de mieloma de ratón para conservar su viabilidad y formar líneas celulares de hibridoma. Las estirpes celulares de hibridoma se rastrearon y se seleccionaron para identificar estirpes celulares que produjeran anticuerpos específicos de IL-33. Usando esta técnica, se obtuvieron distintos anticuerpos quiméricos anti-IL-33 (es decir, anticuerpos que poseen dominios variables humanos y dominios constantes de ratón); los anticuerpos ilustrativos generados de esta manera se denominaron del siguiente modo: H1M9559N, H1M9566N, H1M9568N y H1M9565N. Los dominios variables humanos de los anticuerpos quiméricos se clonaron posteriormente en dominios constantes humanos para producir anticuerpos anti-IL-33 completamente humanos como se describe en el presente documento.

También se aislaron anticuerpos anti-IL-33 directamente de linfocitos B positivos en antígeno sin fusión a células de mieloma, como se describe en el documento US 2007/0280945A1. Usando este método, se obtuvieron varios anticuerpos anti-IL-33 completamente humanos (es decir, anticuerpos que poseen dominios variables humanos y dominios constantes humanos); los anticuerpos ilustrativos generados de esta manera se denominaron del siguiente modo: H4H9629P, H4H9633P, H4H9640P, H4H9659P, H4H9660P, H4H9662P, H4H9663P, H4H9664P, H4H9665P, H4H9666P, H4H9667P, H4H9670P, H4H9671P, H4H9672P, H4H9675P y H4H9676P.

En los ejemplos expuestos a continuación, se describen detalladamente determinadas propiedades biológicas de los anticuerpos anti-IL-33 ilustrativos generados de acuerdo con los métodos de este ejemplo.

40 Ejemplo 2. Secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y ligera

La Tabla 1 expone los pares de secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y ligera, y las secuencias de CDR, de anticuerpos anti-IL-33 seleccionados y sus correspondientes identificadores de anticuerpos.

Tabla 1

Denominación del anticuerpo	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
9559N	2	4	6	8	10	12	14	16
9566N	18	20	22	24	26	28	30	32
9568N	34	36	38	40	42	44	46	48
9629P	50	52	54	56	58	60	62	64
9633P	66	68	70	72	74	76	78	80
9640P	82	84	86	88	90	92	94	96
9659P	98	100	102	104	106	108	110	112
9660P	114	116	118	120	122	124	126	128
9662P	130	132	134	136	138	140	142	144
9663P	146	148	150	152	154	156	158	160
9664P	162	164	166	168	170	172	174	176
9665P	178	180	182	184	186	188	190	192
9666P	194	196	198	200	202	204	206	208
9667P	210	212	214	216	218	220	222	224
9670P	226	228	230	232	234	236	238	240
9671P	242	244	246	248	250	252	254	256

(continuación)

Denominación del anticuerpo	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
9672P	258	260	262	264	266	268	270	272
9675P	274	276	278	280	282	284	286	288
9676P	290	292	294	296	298	300	302	304
9565N	308	310	312	314	316	318	320	322

Los anticuerpos normalmente se denominan en el presente documento de acuerdo con la siguiente nomenclatura: Prefijo de Fc (por ejemplo, "H1M" o "H4H"), seguido de un identificador numérico (por ejemplo, "9559", "9566" o "9629" como se muestra en la Tabla 1), seguido de una "P" o un sufijo "N". Por tanto, de acuerdo con esta nomenclatura, un anticuerpo puede denominarse en el presente documento, por ejemplo, "H1M9559N" "H1M9566N" "H4H9629P" etc. Los prefijos H1M y H4H en las designaciones de anticuerpos usados en el presente documento indican el isotipo particular de la región Fc del anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo "H1M" tiene un Fc de IgG1 de ratón, mientras que un anticuerpo "H4H" tiene un Fc de IgG4 humana. Como apreciará un experto en la materia, un anticuerpo que tiene un isotipo Fc particular puede convertirse en un anticuerpo con un isotipo Fc diferente (por ejemplo, un anticuerpo con un Fc de IgG1 de ratón puede convertirse en un anticuerpo con una IgG4 humana, etc.), pero en cualquier caso, los dominios variables (incluidas las CDR) - que se indican mediante los identificadores numéricos que se muestran en la Tabla 1 - permanecerán iguales y se espera que las propiedades de unión sean idénticas o sustancialmente similares, independientemente de la naturaleza del dominio Fc.

5 Ejemplo 3. Anticuerpo que se une a la IL-33 humana según lo determinado por la resonancia plasmática superficial

Se determinaron las constantes de disociación de equilibrio (valores de K_D) para la unión de IL-33 a anticuerpos monoclonales anti-IL-33 purificados usando un biosensor de resonancia de plasmón superficial en tiempo real usando un instrumento Biacore 4000. La superficie del sensor Biacore se derivatizó primero mediante el acoplamiento de amina con un anticuerpo policlonal de conejo anti-ratón (GE, n.º BR-1008-38) o con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Fc humano (GE, n.º BR-1008-39) para capturar anticuerpos monoclonales anti-IL-33 expresados con regiones constantes de IgG4 humanas o de ratón, respectivamente. Todos los estudios de unión de Biacore se realizaron en ADA 0,01 M a pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM y tensioactivo Tween-20 al 0,05 % v/v (tampón de funcionamiento ABS-ET). Se inyectaron diferentes concentraciones de IL-33 humana (hIL-33; R&D Systems, n.º 3625-IL-010/CF) o IL-33 de macaco cangrejero expresadas con un marcador de hexahistidina C-terminal (MfIL-33-6His; SEQ ID NO: 305) preparado en tampón de funcionamiento ABS-ET (que varía de 100 nM a 3,7 nM, diluciones con factor de dilución de 3) sobre la superficie capturada de anticuerpo monoclonal anti-IL-33 a un caudal de 30 ml/minuto. Se controló la asociación de hIL-33 o MfIL-33-6H con el anticuerpo monoclonal capturado durante 4 minutos y su disociación en el tampón de ejecución ABS-ET durante 10 minutos. El efecto de un pH reducido en la unión de cada anticuerpo anti-IL-33 a hIL-33 o MfIL-33-6 se estudió usando un formato de ensayo de seguimiento de pH en línea en ADA 0,01 M pH 6,0, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM y tensioactivo Tween-20 al 0,05 % v/v (tampón ABS-ET a pH 6). Para conseguir esto, se controló la asociación de hIL-33 o MfIL-33-6His al anticuerpo monoclonal capturado durante 4 minutos en tampón de ejecución ABS-ET. Tras una disociación de 30 segundos de hIL-33 o MfIL-33-6His en el tampón de ejecución ABS-ET, se inyectó el tampón ABS-ET a pH 6 durante 3 minutos y se midió la disociación del analito en condiciones de pH bajo. Todos los experimentos cinéticos de unión se realizaron a 25 °C y 37 °C. Las constantes de asociación cinética (k_a) y disociación (k_d) se determinaron ajustando los sensogramas en tiempo real a un modelo de unión 1:1 usando el programa informático de ajuste de curvas Scrubber 2.0c. Las constantes de equilibrio de disociación de unión (K_D) y las semividas disociativas ($t_{1/2}$) se calcularon a partir de las constantes de velocidad cinética como:

$$K_D (M) = k_d/k_a \text{ y } t_{1/2} (\text{min}) = \ln(2)/(60 \cdot k_d)$$

)

Los parámetros cinéticos de unión para la unión de hIL-33 y MfIL-33-6His a diferentes anticuerpos monoclonales anti-IL-33 a 25 °C y 37 °C se muestran en las Tablas 2 a 5. A 25 °C, hIL-33 unido a los anticuerpos anti-IL-33 con valores de K_D que varían de 78 pM a 757 pM, como se muestra en la Tabla 2. A 37 °C, hIL-33 unido a los anticuerpos anti-IL-33 con valores de K_D que varían de 411 pM a 2,03 nM, como se muestra en la Tabla 3. Tanto a 25 °C como a 37 °C, un anticuerpo anti-IL-33 demostró una unión débil y, por lo tanto, sus parámetros cinéticos de unión no pudieron ajustarse usando un modelo de unión 1:1. A 25 °C, MfIL-33-6 se une a los anticuerpos anti-IL-33 con valores de K_D que varían de 333 pM a 38 nM, como se muestra en la Tabla 4. A 37 °C, MfIL-33-6His unido a los anticuerpos anti-IL-33 con valores de K_D que varían de 1 pM a 48,6 nM, como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 2: Parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-IL-33 que se unen a IL-33 humana a 25 °C.

Anticuerpo capturado	Cinética de unión de IL-33 humana en tampón de ejecución ABS-ET				Seguimiento en línea en tampón ABS-ET a pH 6		
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (min)	Proporción de $t_{1/2}$ (pH 7,4/pH 6,0)
H4H9675P	$1,02 \times 10^6$	$2,58 \times 10^{-4}$	$2,54 \times 10^{-10}$	45	$1,11 \times 10^{-3}$	10	4,3
H4H9662P	$8,11 \times 10^5$	$2,50 \times 10^{-4}$	$3,08 \times 10^{-10}$	46	$8,26 \times 10^{-4}$	14	3,3
H4H9640P	$9,12 \times 10^5$	$2,37 \times 10^{-4}$	$2,60 \times 10^{-10}$	49	$6,57 \times 10^{-4}$	18	2,8
H4H9629P	$7,77 \times 10^5$	$2,26 \times 10^{-4}$	$2,90 \times 10^{-10}$	51	$1,28 \times 10^{-3}$	9	5,7
H4H9659P	$5,26 \times 10^5$	$1,72 \times 10^{-4}$	$3,27 \times 10^{-10}$	67	$6,64 \times 10^{-4}$	17	3,9
H4H9660P	$6,96 \times 10^5$	$2,24 \times 10^{-4}$	$3,22 \times 10^{-10}$	52	$7,08 \times 10^{-4}$	16	3,2
H4H9667P	$6,37 \times 10^5$	$2,52 \times 10^{-4}$	$3,95 \times 10^{-10}$	46	$5,66 \times 10^{-4}$	20	2,2
H4H9670P	$7,86 \times 10^5$	$2,89 \times 10^{-4}$	$3,68 \times 10^{-10}$	40	$8,25 \times 10^{-4}$	14	2,9
H4H9663P	$1,36 \times 10^6$	$4,14 \times 10^{-4}$	$3,05 \times 10^{-10}$	28	$1,10 \times 10^{-3}$	11	2,7
H4H9666P	$5,08 \times 10^5$	$2,80 \times 10^{-4}$	$5,51 \times 10^{-10}$	41	$1,34 \times 10^{-3}$	9	4,8
H4H9676P	$1,03 \times 10^6$	$3,45 \times 10^{-4}$	$3,34 \times 10^{-10}$	33	$1,21 \times 10^{-3}$	10	3,5
H4H9633P	$6,56 \times 10^5$	$2,83 \times 10^{-4}$	$4,32 \times 10^{-10}$	41	$8,10 \times 10^{-4}$	14	2,9
H4H9671P	$7,71 \times 10^5$	$3,49 \times 10^{-4}$	$4,53 \times 10^{-10}$	33	$1,62 \times 10^{-3}$	7	4,6
H4H9672P	$6,68 \times 10^5$	$3,52 \times 10^{-4}$	$5,27 \times 10^{-10}$	33	$1,41 \times 10^{-3}$	8	4,0
H4H9665P	$8,88 \times 10^5$	$4,74 \times 10^{-4}$	$5,33 \times 10^{-10}$	24	$2,12 \times 10^{-3}$	5	4,5
H4H9664P	$3,39 \times 10^5$	$2,57 \times 10^{-4}$	$7,57 \times 10^{-10}$	45	$8,23 \times 10^{-4}$	14	3,2
H1M9568N	$7,02 \times 10^5$	$1,30 \times 10^{-4}$	$1,84 \times 10^{-10}$	89	$1,78 \times 10^{-4}$	65	1,4
H1M9566N	$1,27 \times 10^5$	$1,00 \times 10^{-5**}$	$7,88 \times 10^{-11**}$	1155**	$1,10 \times 10^{-4}$	105	11,0
H1M9559N	$4,04 \times 10^5$	$2,74 \times 10^{-4}$	$6,78 \times 10^{-10}$	42	$1,87 \times 10^{-4}$	62	0,7
H1M9565N	CI*	CI*	CI*	CI*	CI*	CI*	CI*

CI*: no concluyente, ya que se observó una unión muy débil en las condiciones experimentales y los datos de unión en tiempo real no pudieron ajustarse de manera fiable en el modelo de unión 1:1.

** En condiciones experimentales, no se observó disociación de IL33 del anticuerpo monoclonal capturado, por lo tanto, el valor de k_d se fijó en $1,00 \times 10^{-5}$, y los valores derivados de $t_{1/2}$ y K_D representan los límites inferior y superior, respectivamente.

Tabla 3: Parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-IL-33 que se unen a IL-33 humana a 37 °C.

Anticuerpo capturado	Cinética de unión de IL-33 humana en tampón de ejecución ABS-ET				Seguimiento en línea en tampón ABS-ET a pH 6		
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (min)	Proporción de $t_{1/2}$ (pH 7,4/pH 6,0)
H4H9675P	$2,12 \times 10^6$	$8,72 \times 10^{-4}$	$4,11 \times 10^{-10}$	13	$4,63 \times 10^{-3}$	2	5,3
H4H9662P	$1,40 \times 10^6$	$6,20 \times 10^{-4}$	$4,43 \times 10^{-10}$	19	$3,83 \times 10^{-3}$	3	6,2

(continuación)

Anticuerpo capturado	Cinética de unión de IL-33 humana en tampón de ejecución ABS-ET				Seguimiento en línea en tampón ABS-ET a pH 6		
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (min)	Proporción de $t_{1/2}$ (pH 7,4/pH 6,0)
H4H9640P	$1,15 \times 10^6$	$5,73 \times 10^{-4}$	$4,98 \times 10^{-10}$	20	$2,65 \times 10^{-3}$	4	4,6
H4H9629P	$1,27 \times 10^6$	$6,46 \times 10^{-4}$	$5,08 \times 10^{-10}$	18	$5,82 \times 10^{-3}$	2	9,0
H4H9659P	$7,07 \times 10^5$	$4,03 \times 10^{-4}$	$5,70 \times 10^{-10}$	29	$2,99 \times 10^{-3}$	4	7,4
H4H9660P	$8,03 \times 10^5$	$4,79 \times 10^{-4}$	$5,96 \times 10^{-10}$	24	$3,23 \times 10^{-3}$	4	6,8
H4H9667P	$9,76 \times 10^5$	$6,03 \times 10^{-4}$	$6,18 \times 10^{-10}$	19	$2,44 \times 10^{-3}$	5	4,0
H4H9670P	$1,16 \times 10^6$	$7,83 \times 10^{-4}$	$6,76 \times 10^{-10}$	15	$3,83 \times 10^{-3}$	3	4,9
H4H9663P	$1,83 \times 10^6$	$1,24 \times 10^{-3}$	$6,77 \times 10^{-10}$	9	$4,62 \times 10^{-3}$	3	3,7
H4H9666P	$1,13 \times 10^6$	$7,70 \times 10^{-4}$	$6,81 \times 10^{-10}$	15	$6,80 \times 10^{-3}$	2	8,8
H4H9676P	$1,38 \times 10^6$	$1,28 \times 10^{-3}$	$9,22 \times 10^{-10}$	9	$5,24 \times 10^{-3}$	2	4,1
H4H9633P	$7,40 \times 10^5$	$6,89 \times 10^{-4}$	$9,31 \times 10^{-10}$	17	$2,40 \times 10^{-3}$	5	3,5
H4H9671P	$1,21 \times 10^6$	$1,14 \times 10^{-3}$	$9,38 \times 10^{-10}$	10	$5,85 \times 10^{-3}$	2	5,1
H4H9672P	$1,09 \times 10^6$	$1,15 \times 10^{-3}$	$1,05 \times 10^{-9}$	10	$5,41 \times 10^{-3}$	2	4,7
H4H9665P	$1,21 \times 10^6$	$1,44 \times 10^{-3}$	$1,19 \times 10^{-9}$	8	$9,65 \times 10^{-3}$	1	6,7
H4H9664P	$5,19 \times 10^5$	$7,21 \times 10^{-4}$	$1,39 \times 10^{-9}$	16	$2,79 \times 10^{-3}$	4	3,9
H1M9568N	$6,72 \times 10^5$	$9,61 \times 10^{-4}$	$1,43 \times 10^{-9}$	12	$1,10 \times 10^{-3}$	10	1,1
H1M9566N	$1,66 \times 10^5$	$2,83 \times 10^{-4}$	$1,70 \times 10^{-9}$	41	$9,67 \times 10^{-4}$	12	3,4
H1M9559N	$4,73 \times 10^5$	$9,62 \times 10^{-4}$	$2,03 \times 10^{-9}$	12	$9,92 \times 10^{-4}$	12	1,0
H1M9565N	CI*	CI*	CI*	CI*	CI*	CI*	CI*

CI*: no concluyente, ya que se observó una unión muy débil en las condiciones experimentales y los datos de unión en tiempo real no pudieron ajustarse de manera fiable en el modelo de unión 1:1.

Tabla 4: Parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-IL-33 que se unen a MfIL-33-6His a 25 °C.

Anticuerpo capturado	Cinética de unión de MfIL-33-6His en tampón de ejecución ABS-ET				Seguimiento en línea en tampón ABS-ET a pH 6		
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (min)	Proporción de $t_{1/2}$ (pH 7,4/pH 6,0)
H4H9675P	$5,06 \times 10^5$	$1,29 \times 10^{-3}$	$2,55 \times 10^{-9}$	9	$1,56 \times 10^{-3}$	7	1,2
H4H9662P	$3,53 \times 10^5$	$4,42 \times 10^{-4}$	$1,25 \times 10^{-9}$	26	$1,17 \times 10^{-4}$	99	0,3
H4H9640P	$4,50 \times 10^5$	$1,37 \times 10^{-3}$	$3,06 \times 10^{-9}$	8	$5,01 \times 10^{-4}$	23	0,4
H4H9629P	$5,62 \times 10^5$	$1,35 \times 10^{-2}$	$2,39 \times 10^{-8}$	0,9	$3,58 \times 10^{-2}$	0,3	2,7
H4H9659P	$3,25 \times 10^5$	$4,86 \times 10^{-4}$	$1,50 \times 10^{-9}$	24	$1,23 \times 10^{-4}$	94	0,3
H4H9660P	$4,26 \times 10^5$	$1,49 \times 10^{-3}$	$3,49 \times 10^{-9}$	8	$1,08 \times 10^{-3}$	11	0,7
H4H9667P	$3,43 \times 10^5$	$9,91 \times 10^{-4}$	$2,89 \times 10^{-9}$	12	$6,96 \times 10^{-4}$	17	0,7

(continuación)

Anticuerpo capturado	Cinética de unión de MfIL-33-6His en tampón de ejecución ABS-ET				Seguimiento en línea en tampón ABS-ET a pH 6		
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_d (M)	$t_{1/2}$ (min)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (min)	Proporción de $t_{1/2}$ (pH 7,4/pH 6,0)
H4H9670P	$4,40 \times 10^5$	$2,10 \times 10^{-3}$	$4,77 \times 10^{-9}$	6	$3,93 \times 10^{-4}$	29	0,2
H4H9663P	$8,69 \times 10^5$	$9,25 \times 10^{-4}$	$1,06 \times 10^{-9}$	12	$6,83 \times 10^{-4}$	17	0,7
H4H9666P	$2,22 \times 10^5$	$3,54 \times 10^{-3}$	$1,59 \times 10^{-8}$	3,3	$8,09 \times 10^{-3}$	1,4	2,3
H4H9676P	$8,52 \times 10^5$	$4,12 \times 10^{-3}$	$4,84 \times 10^{-9}$	2,8	$1,45 \times 10^{-3}$	8	0,4
H4H9633P	$2,62 \times 10^5$	$9,97 \times 10^{-3}$	$3,80 \times 10^{-8}$	1,2	$2,87 \times 10^{-3}$	4	0,3
H4H9671P	$5,87 \times 10^5$	$1,50 \times 10^{-3}$	$2,55 \times 10^{-9}$	8	$1,61 \times 10^{-3}$	7	1,1
H4H9672P	$4,37 \times 10^5$	$3,60 \times 10^{-3}$	$8,22 \times 10^{-9}$	3,2	$2,67 \times 10^{-3}$	4	0,7
H4H9665P	$5,57 \times 10^5$	$5,66 \times 10^{-4}$	$1,02 \times 10^{-9}$	20	$7,53 \times 10^{-4}$	15	1,3
H4H9664P	$1,40 \times 10^5$	$1,65 \times 10^{-3}$	$1,18 \times 10^{-8}$	7	$4,80 \times 10^{-4}$	24	0,3
H1M9568N	$2,44 \times 10^5$	$2,61 \times 10^{-4}$	$1,07 \times 10^{-9}$	44	$3,02 \times 10^{-4}$	38	1,2
H1M9566N	$2,93 \times 10^5$	$9,75 \times 10^{-5}$	$3,33 \times 10^{-10}$	119	$1,26 \times 10^{-4}$	91	1,3
H1M9559N	$3,21 \times 10^5$	$1,23 \times 10^{-3}$	$3,82 \times 10^{-9}$	9	$1,52 \times 10^{-3}$	8	1,2
H1M9565N	$4,06 \times 10^4$	$7,20 \times 10^{-5}$	$1,77 \times 10^{-9}$	160	$1,43 \times 10^{-4}$	81	2,0

Tabla 5: Parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-IL-33 que se unen a MfIL-33-6His a 37 °C.

Anticuerpo capturado	Cinética de unión de MfIL-33-6His en tampón de ejecución ABS-ET				Seguimiento en línea en tampón ABS-ET a pH 6		
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (min)	Proporción de $t_{1/2}$ (pH 7,4/pH 6,0)
H4H9675P	$1,02 \times 10^6$	$4,91 \times 10^{-3}$	$4,81 \times 10^{-9}$	2,4	$7,35 \times 10^{-3}$	1,6	1,5
H4H9662P	$7,07 \times 10^5$	$1,58 \times 10^{-3}$	$2,24 \times 10^{-9}$	7	$1,68 \times 10^{-3}$	7	1,1
H4H9640P	$8,10 \times 10^5$	$4,36 \times 10^{-3}$	$5,38 \times 10^{-9}$	2,6	$2,26 \times 10^{-3}$	5	0,5
H4H9629P	$1,07 \times 10^6$	$3,47 \times 10^{-2}$	$3,24 \times 10^{-8}$	0,3	FT*	FT*	FT*
H4H9659P	$5,98 \times 10^5$	$1,86 \times 10^{-3}$	$3,11 \times 10^{-9}$	6	$1,02 \times 10^{-3}$	11	0,5
H4H9660P	$6,80 \times 10^5$	$4,44 \times 10^{-3}$	$6,53 \times 10^{-9}$	2,6	$4,63 \times 10^{-3}$	2,5	1,0
H4H9667P	$6,81 \times 10^5$	$3,17 \times 10^{-3}$	$4,66 \times 10^{-9}$	4	$2,68 \times 10^{-3}$	4	0,8
H4H9670P	$7,35 \times 10^5$	$5,03 \times 10^{-3}$	$6,84 \times 10^{-9}$	2,3	$1,65 \times 10^{-3}$	7	0,3
H4H9663P	$1,62 \times 10^6$	$3,61 \times 10^{-3}$	$2,22 \times 10^{-9}$	3,2	$3,54 \times 10^{-3}$	3,3	1,0
H4H9666P	$4,32 \times 10^5$	$1,41 \times 10^{-2}$	$3,27 \times 10^{-8}$	0,8	FT*	FT*	FT*
H4H9676P	$1,87 \times 10^6$	$1,44 \times 10^{-2}$	$7,70 \times 10^{-9}$	0,8	FT*	FT*	FT*
H4H9633P	$4,68 \times 10^5$	$2,27 \times 10^{-2}$	$4,86 \times 10^{-8}$	0,5	FT*	FT*	FT*
H4H9671P	$1,20 \times 10^6$	$6,07 \times 10^{-3}$	$5,08 \times 10^{-9}$	1,9	$8,19 \times 10^{-3}$	1,4	1,3
H4H9672P	$9,46 \times 10^5$	$1,30 \times 10^{-2}$	$1,37 \times 10^{-8}$	0,9	FT*	FT*	FT*
H4H9665P	$1,10 \times 10^6$	$2,10 \times 10^{-3}$	$1,91 \times 10^{-9}$	5	$4,00 \times 10^{-3}$	2,9	1,9

(continuación)

Anticuerpo capturado	Cinética de unión de MfIL-33-6His en tampón de ejecución ABS-ET				Seguimiento en línea en tampón ABS-ET a pH 6		
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (min)	Proporción de $t_{1/2}$ (pH 7,4/pH 6,0)
H4H9664P	$3,61 \times 10^5$	$5,84 \times 10^{-3}$	$1,62 \times 10^{-8}$	2,0	$1,93 \times 10^{-3}$	6	0,3
H1M9568N	$3,89 \times 10^5$	$1,73 \times 10^{-3}$	$4,46 \times 10^{-9}$	7	$2,24 \times 10^{-3}$	5	1,3
H1M9566N	$3,99 \times 10^5$	$4,00 \times 10^{-4}$	$1,00 \times 10^{-9}$	29	$1,15 \times 10^{-3}$	10	2,9
H1M9559N	$4,93 \times 10^5$	$3,47 \times 10^{-3}$	$7,04 \times 10^{-9}$	3,3	$3,07 \times 10^{-3}$	4	0,9
H1M9565N	$7,82 \times 10^4$	$2,02 \times 10^{-4}$	$2,59 \times 10^{-9}$	57	$2,28 \times 10^{-4}$	51	1,1

*FT: $t_{1/2}$ rápida como lo fue la de MfIL-33-6His unido al anticuerpo monoclonal anti-IL-33 capturado

Ejemplo 4. Los anticuerpos anti-IL-33 bloquean la unión de IL-33 al receptor ST2 humano

Se midió la capacidad de los anticuerpos anti-IL-33 para bloquear bien la unión de IL-33 humana (hIL-33) o de IL-33 de macaco cangrejero con el receptor de ST2 usando un ELISA de tipo sándwich de competición. Se recubrió una parte del dominio ecto de la proteína ST2 humana que se expresó con un marcador de Fc de IgG1 humana C-terminal (hST2-hFc; SEQ ID NO: 306), a una concentración de 1 mg/ml en tampón PBS en una placa de microtitulación de 96 pocillos durante la noche a 4 °C. Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon posteriormente usando una solución de BSA (*Bovine Serum Albumin*, albúmina de suero bovino) al 0,5 % (p/v) en PBS. Concentraciones constantes bien de la proteína hIL-33 biotinilada 30 pM (sistemas de I + D, Cat n.º 3625-IL/CF) (hIL-33 biotinilada) o de IL-33 de macaco cangrejero 150 pM expresada con marcador de hexahistidina (MfIL-33-6His; SEQ ID NO: 305) se añadieron por separado a las diluciones en serie de anticuerpos, de modo que las concentraciones finales de anticuerpos variaron entre 0 y 100 nM. Se incubaron las mezclas de anticuerpo/IL-33 durante 1 hora a temperatura ambiente antes de transferirse a las placas de microtitulación recubiertas con hST2-hFc. Tras incubación durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron después los pocillos y se detectó hIL-33 biotinilada unida a placa con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Thermo Scientific, Cat n.º N200), y se detectó MfIL-33-6 unido a la placa con un anticuerpo monoclonal anti-His conjugado con HRP (Qiagen, n.º 34460). Todas las muestras se desarrollaron con una solución de TMB (BD biosciences, n.º 51-2607KC) para producir una reacción colorimétrica y luego se inactivaron mediante acidificación con ácido sulfúrico 1 M antes de medir la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Victor X5. El análisis de datos se realizó usando un modelo de dosis-respuesta sigmoidal dentro del programa informático Prism™. El valor de Cl_{50} calculado, definido como la concentración de anticuerpo necesaria para reducir en un 50 % con respecto a la señal máxima la unión de hIL-33 biotinilada o MfIL-33-6 a hST2-hFc que recubre la placa, se usó como indicador de la potencia de bloqueo. El porcentaje de bloqueo se calculó como la proporción de la reducción en la señal observada en presencia de anticuerpos con respecto a la diferencia entre la señal con IL-33 solo y el fondo (señal del anticuerpo secundario conjugado con HRP o de estreptavidina sola). La absorbancia medida para la concentración constante de hIL-33 biotinilada o MfIL-33-6His solo se define como el 0 % del bloqueo y la absorbancia medida para la no adición de IL-33 se define como el 100 % del bloqueo. Los valores de absorbancia de los pocillos que contenían la concentración más alta para cada anticuerpo se usaron para determinar el porcentaje de bloqueo máximo.

Tabla 6: Bloqueo por ELISA de la unión de hIL-33 biotinilada o MfIL-33-6His a hST2-hFc por anticuerpos anti-IL-33

ID de anticuerpo	Bloqueo de hIL-33 biotinilada 30 pM en hST2-hFc, Cl_{50} (M)	% de bloqueo máximo de hIL-33 biotinilada en hST2-hFc	Bloqueo de Mf-IL-33-6His 150 pM en hST2-hFc, Cl_{50} (M)	% de bloqueo máximo de Mf-IL-33-6His en hST2-hFc
H1M9559N*	$1,4 \times 10^{-10}$	88	$1,0 \times 10^{-8}$	53
H1M9566N*	$3,2 \times 10^{-10}$	69	$2,2 \times 10^{-10}$	41
H1M9565N*	$2,2 \times 10^{-8}$	68	$1,2 \times 10^{-8}$	86
H1M9568N*	$1,9 \times 10^{-10}$	55	$8,4 \times 10^{-10}$	38
H4H9629P	$4,5 \times 10^{-10}$	80	N/A	NBI
H4H9633P	$4,4 \times 10^{-10}$	66	N/A	NBI
H4H9640P	$3,5 \times 10^{-10}$	78	$3,5 \times 10^{-9}$	73
H4H9659P	$4,0 \times 10^{-10}$	78	$6,0 \times 10^{-10}$	92
H4H9660P	$3,1 \times 10^{-10}$	57	$4,2 \times 10^{-9}$	68
H4H9662P	$1,0 \times 10^{-9}$	77	$8,6 \times 10^{-10}$	87
H4H9663P	$5,0 \times 10^{-10}$	74	$1,2 \times 10^{-9}$	81
H4H9664P	$3,0 \times 10^{-10}$	73	$3,8 \times 10^{-9}$	67
H4H9665P	$8,7 \times 10^{-10}$	55	$4,2 \times 10^{-10}$	81
H4H9666P	$6,0 \times 10^{-10}$	71	$1,3 \times 10^{-8}$	40

(continuación)

ID de anticuerpo	Bloqueo de hIL-33 biotinilada 30 pM en hST2-hFc, Cl_{50} (M)	% de bloqueo máximo de hIL-33 biotinilada en hST2-hFc	Bloqueo de Mf-IL-33-6His 150 pM en hST2-hFc, Cl_{50} (M)	% de bloqueo máximo de Mf-IL-33-6His en hST2-hFc
H4H9667P	$4,1 \times 10^{-10}$	78	$4,1 \times 10^{-9}$	72
H4H9670P	$4,8 \times 10^{-10}$	69	$3,5 \times 10^{-9}$	69
H4H9671P	$4,6 \times 10^{-10}$	46	$5,8 \times 10^{-10}$	62
H4H9672P	$4,4 \times 10^{-10}$	63	$5,5 \times 10^{-9}$	48
H4H9675P	$4,4 \times 10^{-10}$	58	$1,5 \times 10^{-9}$	72
H4H9676P	$4,6 \times 10^{-10}$	54	$3,2 \times 10^{-9}$	57
N/A = no aplicable NBI = no bloqueador * = Experimento realizado en un día separado				

Los experimentos de unión para 20 anticuerpos se realizaron en dos días separados, como se indica en la Tabla 6. Los 20 anticuerpos anti-IL-33 bloquearon la unión de hIL-33 biotinilada a hST2-hFc con valores de Cl_{50} que varían de 140 pM a 22 nM y un porcentaje de bloqueo máximo que varía del 46 % al 88 %. Dieciocho de los 20 anticuerpos anti-IL-33 bloquearon la unión de MfIL-33-6His a hST2-hFc con valores de Cl_{50} que varían de 220 pM a 13 nM y el porcentaje de bloqueo máximo varía del 38 % al 92 %, como se muestra en la Tabla 6. Dos de los anticuerpos probados, H4H9629P y H4H9633P, no demostraron un bloqueo medible de la unión de MfIL-33-6His a hST2-hFc.

Ejemplo 5. Inhibición de la unión de IL-33 al anticuerpo monoclonal anti-IL-33 por ST2 como se muestra por el Análisis Biacore

Se probó la capacidad de los anticuerpos anti-IL-33 para unirse a un complejo previamente formado de IL-33 con ST2 usando el instrumento Biacore T-200 dotado de un biosensor de resonancia de plasmón superficial en tiempo real. El experimento se realizó a 25 °C con un tampón compuesto de HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM y Tensioactivo Tween-20 al 0,05 % v/v (HBS-ET). Primero se derivatizó la superficie del sensor Biacore mediante el acoplamiento de amina de un anticuerpo monoclonal específico del marcador anti-myc (Clon n.º 9E10), y en este sensor derivado se capturaron aproximadamente 160 unidades de respuesta (UR) de proteína ST2 humana expresada con un marcador de myc-myc-hexahistidina C-terminal (hST2-MMH; SEQ ID NO: 323). Se saturó la superficie de hST2-MMH capturada inyectando 100 nM de IL-33 humana (hIL-33; R&D Systems, n.º 3625-IL-010/CF) durante 3 minutos seguido de una inyección de 3 minutos de una solución 100 nM del anticuerpo monoclonal anti-IL-33. La respuesta de unión en tiempo real se controló en el transcurso del experimento, y se registró la respuesta de unión observada a los 3 minutos después de la inyección del anticuerpo anti-IL-33 al complejo previamente formado de hIL-33, y se registró el hST2-MMH capturado, y se tabuló y se mostró en la Tabla 7. No se observó unión no específica del anticuerpo monoclonal anti-IL-33 a la superficie de captura del marcador anti-myc. Como se muestra en la Tabla 7, 17 de los anticuerpos probados no mostraron una unión medible a hIL-33 tras complejarse previamente con hST2-MMH, mientras que tres anticuerpos (H1M9565N, H1M9566N y H1M9568N) se unieron a hIL-33 tras complejarse previamente con hST2-MMH.

Tabla 7: Unión de anticuerpos anti-IL-33 a un complejo previamente formado de hIL-33 y hST2-MMH

Anticuerpo	Respuesta de unión a anticuerpos (UR)
H4H9629P	-1
H4H9633P	-1
H4H9640P	-1
H4H9659P	-1
H4H9660P	-1
H4H9662P	0
H4H9663P	-1
H4H9664P	-1
H4H9665P	0
H4H9666P	-1
H4H9667P	-1
H4H9670P	-1
H4H9671P	-1
H4H9672P	-1
H4H9675P	-1
H4H9676P	-1
H1M9559N	-4
H1M9565N	11
H1M9566N	13
H1M9568N	131

Ejemplo 6. Inhibición de la señalización del receptor mediada por IL-33 por anticuerpos anti-IL-33

La interleucina-33 (IL-33) es un ligando para ST2, un miembro de la superfamilia de receptores de tipo Toll/interleucina-1 que se asocia con una proteína auxiliar, IL-1 RAcP (para revisión, véase Kakkar y Lee, 2008). Tras la activación de ST2/IL-1 RAcP por IL-33, se activa una cascada de señalización a través de moléculas en dirección 3', tales como MyD88 (factor 88 de diferenciación mieloide) y TRAF6 (factor 6 asociado al receptor de TNF), lo que conduce a la activación de NFkB (factor nuclear kB), entre otros. Para desarrollar un sistema de bioensayo biológicamente relevante para probar anticuerpos anti-IL-33, se transfectaron células de riñón embrionario humano (HEK293) de manera estable para expresar ST2 humano (aminoácidos 1-556 del número de acceso NP_057316) junto con un indicador de luciferasa [elemento de respuesta NFkB (5x)-luciferasa-IRES-GFP] (estirpe celular de HEK293/hST2/NFkB-luciferasa). La estirpe celular HEK293 expresa la IL-1 RAcP de forma endógena, y la activación de NFkB por IL-33 en células HEK293 se ha demostrado previamente (Schmitz *et al.*, *Immunity* 23: 479-490 (2005)). La estirpe celular estable se aisló y se mantuvo en FBS al 10 %, DMEM, NEAA, penicilina/estreptomycin y G418.

Para el bioensayo, se sembraron células HEK293/hST2/NFkB-luciferasa en placas de ensayo de 96 pocillos a 10.000 células por pocillo en medio con bajo contenido de suero que contenía FBS al 0,1 % p/v y OPTIMEM (Invitrogen, n.º 31985-070) y luego se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5 % durante la noche. Al día siguiente, para determinar la respuesta a la dosis de IL-33, se diluyeron en serie a 1:3 IL-33 humana (hIL-33; R&D Systems, n.º 3625-IL) o IL-33 de macaco cangrejero expresada con un marcador de hexahistidina C-terminal (MfIL-33-6His; SEQ ID NO: 305) y se añadieron a las células a partir de 10 nM y con un intervalo de hasta 0,0002 nM, más una muestra de control que no contenía IL-33. Para medir la inhibición, los anticuerpos se diluyeron en serie y se añadieron a las células, seguido de la adición de concentraciones constantes de IL-33 (hIL-33 10 pM para el ensayo humano y MfIL-33-6His 5 pM para el ensayo de mono). Se realizaron diluciones en serie de anticuerpos triples antes de la adición a las células, comenzando desde 100 pM y variando hasta 0,002 nM o comenzando desde 10 nM y variando hasta 0,0002 nM. Además de la serie de dilución de anticuerpos, también se incluyó un pocillo que contenía la concentración constante de IL-33 pero sin ningún anticuerpo. Tras 5,5 horas de incubación a 37 °C en CO₂ al 5 %, se detectó la actividad de luciferasa usando un lector de placas Victor X (Perkin Elmer), y los resultados se analizaron mediante regresión no lineal (logística de 4 parámetros) con Prism 5. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Inhibición de la activación de IL-33 humana y de IL-33 de mono de células HEK293/hST2/NFkB-luciferasa por anticuerpos anti-IL33

Especie	Ser humano				Mono		
CE ₅₀ [M]	2,2 x 10 ⁻¹²		3,5 x 10 ⁻¹²	2,4 x 10 ⁻¹¹	8,2 x 10 ⁻¹³		3,5 x 10 ⁻¹²
IL-33 constante	hIL-33 10 pM				MfIL-33-6His 5 pM		
AbPID	Cl ₅₀ [M]	Notas	Cl ₅₀ [M]	Cl ₅₀ [M]	Cl ₅₀ [M]	Notas	Cl ₅₀ [M]
H1M9559N	2,0 x 10 ⁻⁹				4,9 x 10 ⁻⁸		
H1M9566N	9,5 x 10 ⁻¹⁰	Inhibición parcial (Máx a 66 %)			1,5 x 10 ⁻⁹	Inhibición parcial (Máx a 61 %)	
H1M9565N	2,9 x 10 ⁻⁸				1,7 x 10 ⁻⁸		
H1M9568N	2,5 x 10 ⁻¹⁰	Inhibición parcial (Máx a 48 %)			3,5 x 10 ⁻⁹	Inhibición parcial (Máx a 34 %)	
H4H9629P				1,3 x 10 ⁻¹¹			5,5 x 10 ⁻⁸
H4H9633P			2,2 x 10 ⁻¹⁰				1,3 x 10 ⁻⁷
H4H9640P			3,0 x 10 ⁻¹¹				1,4 x 10 ⁻⁸
H4H9659P			4,7 x 10 ⁻¹¹				3,3 x 10 ⁻⁹
H4H9660P			3,5 x 10 ⁻¹¹				1,9 x 10 ⁻⁸
H4H9662P				2,0 x 10 ⁻¹¹			1,5 x 10 ⁻⁹
H4H9663P			1,3 x 10 ⁻¹⁰				2,7 x 10 ⁻⁹
H4H9664P			5,0 x 10 ⁻¹¹				2,6 x 10 ⁻⁸

(continuación)

Especie	Ser humano				Mono		
CE ₅₀ [M]	2,2 x 10 ⁻¹²		3,5 x 10 ⁻¹²	2,4 x 10 ⁻¹¹	8,2 x 10 ⁻¹³		3,5 x 10 ⁻¹²
IL-33 constante	hIL-33 10 pM				MfIL-33-6His 5 pM		
AbPID	Cl ₅₀ [M]	Notas	Cl ₅₀ [M]	Cl ₅₀ [M]	Cl ₅₀ [M]	Notas	Cl ₅₀ [M]
H4H9665P			9,0 x 10 ⁻¹¹				6,6 x 10 ⁻¹⁰
H4H9666P			3,5 x 10 ⁻¹¹				7,8 x 10 ⁻⁸
H4H9667P			7,1 x 10 ⁻¹¹				1,2 x 10 ⁻⁸
H4H9670P			1,2 x 10 ⁻¹⁰				1,7 x 10 ⁻⁸
H4H9671P				2,5 x 10 ⁻¹¹			4,8 x 10 ⁻⁹
H4H9672P			2,5 x 10 ⁻¹¹				2,0 x 10 ⁻⁸
H4H9675P				7,5 x 10 ⁻¹²			4,1 x 10 ⁻⁹
H4H9676P			3,5 x 10 ⁻¹¹				8,4 x 10 ⁻⁹

Dieciocho de los 20 anticuerpos anti-IL33 bloquearon la estimulación de IL-33 humana de las células HEK293/hST2/NFκB-luciferasa con valores de Cl₅₀ que variaban de 7,5 pM a 29 nM, como se muestra en la Tabla 8. Dos de los anticuerpos probados, H1M9566N y H1M9568N, inhibieron parcialmente la hIL-33 con una inhibición máxima del 48 % y 66 %, con valores de Cl₅₀ de 950 nM y 250 pM, respectivamente. Dieciocho de los 20 anticuerpos anti-IL33 bloquearon la estimulación de MfIL-33-6His de las células HEK293/hST2/NFκB-luciferasa con valores de Cl₅₀ que varían de 660 pM a 130 nM como se muestra en la Tabla 8. Dos de los anticuerpos probados, H1M9566N y H1M9568N, inhibió parcialmente MfIL-33-6His con una inhibición máxima del 61 % y 34 %, con valores Cl₅₀ de 1,5 nM y 3,5 nM, respectivamente.

Ejemplo 7. Inhibición de la desgranulación inducida por IL-33 de basófilos humanos por anticuerpos anti-IL-33

Para evaluar aún más las características *in vitro* de los anticuerpos anti-IL-33 seleccionados, se midió su capacidad para bloquear la desgranulación de basófilos inducida por IL-33. Se purificaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre completa recién extraída de dos donantes humanos diferentes mediante centrifugación en gradiente de densidad. La sangre completa de K2 EDTA se diluyó a 1:1 en RPM11640, se distribuyó cuidadosamente en capas sobre Ficoll-Paque (GE Healthcare, n.º 17-1440-03) y se centrifugó para separar las PBMC. Se aspiró la capa de interfase que contenía la PBMC, se transfirió a un tubo nuevo y se lavó dos veces con tampón MACS que estaba compuesto de una dilución a 1:20 de la solución de BSA de MACS (Miltenyi Biotec, n.º 130-091-376) en solución de enjuague MACS (Miltenyi Biotec, n.º 130-091-222). Se sembraron las PBMC purificadas en una placa de 96 pocillos con fondo en V a una concentración final de ~3,0 x 10⁶ células/ml en 100 ml de tampón MACS. Para preparar los basófilos contenidos en la población de PBMC, se añadió 1 ng de IL-3 (Sigma, n.º H7166-10UG) en 50 ml de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin Ca⁺⁺ o Mg⁺⁺ (DPBS) a la suspensión celular, y luego se incubó a 37 °C durante 10 minutos.

Se realizaron diluciones en serie (1:3) de dos anticuerpos anti-IL-33 ilustrativos diferentes (H4H9675P y H4H9659P) o un anticuerpo de control de isotipo, que variaron de 10 nM a 4,6 pM, más un control sin anticuerpo. Las soluciones se mezclaron con una concentración fija de 100 pM (concentración final) de IL-33 humana (R&D Systems, n.º 3625-IL/CF) o ningún control negativo de IL-33 antes de la adición a la PBMC. Todas las condiciones se probaron por duplicado.

Tras la adición de la IL-33 humana y los anticuerpos a las células, Las células se incubaron a 37 °C durante 20 minutos para facilitar la desgranulación de los basófilos. Luego se detuvo la desgranulación enfriando las placas de ensayo en hielo húmedo durante 5 minutos. Para permitir el análisis de la población de basófilos usada para medir la desgranulación, se añadieron 20 ml de cada uno (según las instrucciones del fabricante) de anti-HLA-DR-FITC (Beckman Coulter, n.º IM0463U), anti-CD123-APC (BD, n.º 560087) y anti-CD203c-PE (Beckman Coulter, n.º IM3575) a cada muestra, y las muestras se mantuvieron a 4 °C durante 20 minutos a oscuras. Las células se centrifugaron, se lavaron con DPBS y luego se volvieron a suspender en formaldehído al 2 % (tampón de fijación) a 4 °C. Al día siguiente, Las células fijadas se analizaron en un BD FACSCanto II para determinar los niveles de desgranulación de los basófilos. Los resultados se resumen en las Tablas 9 y 10.

Tabla 9: Porcentaje de desgranulación de los basófilos humanos inducida por la exposición a IL-33 humana

Donante	IL-33 100 pM		No IL-33	
	Media	DT	Media	DT
655687	68,800	2,263	10,295	0,856
655688	61,600	0,849	9,915	0,969

Tabla 10: Anticuerpo anti-IL-33 que bloquea la desgranulación inducida por IL-33 humana de basófilos humanos

	Donante 655687	Donante 655688
Anticuerpo	CI ₅₀ (M)	CI ₅₀ (M)
H4H9675P	1,329 x 10 ⁻¹⁰	9,712 x 10 ⁻¹¹
H4H9659P	5,786 x 10 ⁻¹⁰	4,465 x 10 ⁻¹⁰
Control de Isotipo	no bloqueante	no bloqueante

Como se muestra en la Tabla 9, a 100 pM, la IL-33 humana indujo la desgranulación de basófilos en dos donantes diferentes con un porcentaje medio de desgranulación del 68,8 % para el donante 655687 y del 61,6 % para el donante 655688.

Como se muestra en la Tabla 10, un anticuerpo anti-IL33, H4H9675P, bloqueó la desgranulación de basófilos inducida por la exposición a IL-33 humana 100 pM con un valor de CI₅₀ de 132,9 pM para el donante 655687, y un valor de CI₅₀ de 97,12 pM para el donante 655688. Otro anticuerpo anti-IL33, H4H9659P, bloqueó la desgranulación de basófilos inducida por la exposición a IL-33 humana 100 pM con un valor de CI₅₀ de 578,6 pM para el donante 655687, y un valor de CI₅₀ de 446,5 pM para el donante 655688. En cambio, el control de isotipo no bloqueó la desgranulación de los basófilos de ninguno de los donantes probados.

Ejemplo 8. Inhibición de IFN-gamma inducida por IL-33 de PBMC humanas por anticuerpos anti-IL-33

Para caracterizar aún más los anticuerpos anti-IL-33, se utilizó un ensayo basado en células primarias usando células mononucleares de sangre periférica (PBMC). El ensayo usado en este ejemplo se basó en los resultados publicados por Smithgall *et al.* en *International Immunology*, 2008, vol. 20 (8) pág. 1019-1030. Para este ensayo, se purificaron las PBMC de sangre completa recién extraída de tres donantes diferentes mediante centrifugación en gradiente de densidad. En resumen, la sangre completa de K2 EDTA se diluyó dos veces en RPMI 1640, se distribuyó cuidadosamente en capas sobre Ficoll-Paque (GE Healthcare, n.º 17-1440-03) y se centrifugó durante 20 minutos. Se aspiró la capa de interfase que contenía la PBMC, se transfirió a un tubo nuevo y se lavó dos veces con PBS. Se sembraron las PBMC aisladas en placas de 96 pocillos de fondo redondo a una concentración final de 5 x 10⁵ células/ml en RPMI 1640 complementado con FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomycin. Las células se incubaron luego con 50 g/ml de IL-12 humana (hIL-12; R&D Systems, n.º 219-IL-025/CF) y una dilución en serie de IL-33 humana (hIL-33; R&D Systems, n.º 3625-IL-010/CF) solo de 10 nM a 0,64 pM, o con 260 pM de hIL-33 en combinación con diluciones en serie de anticuerpos de 100 nM a 6,4 pM. El volumen final fue de 200 µl por pocillo. Cada condición se probó por triplicado. Cuando los anticuerpos estaban presentes, se añadieron a las células tras 30 minutos de incubación previa con hIL-33.

Las células se incubaron durante la noche a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 %, y luego se midieron los niveles de IFNγ en el sobrenadante del cultivo mediante ELISA (R&D Systems, n.º DY285). Para el ELISA, se recubrieron las placas de fondo plano de 96 pocillos con el anticuerpo de captura, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de lavar y bloquear, se añadieron 100 µl de sobrenadante de cultivo sin diluir a las placas y se incubaron durante 2 horas. Los lavados y la detección posteriores se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

La IL-33 humana, en presencia de hIL-12, indujo la liberación de IFNγ a partir de PBMC totales humanas de los tres donantes diferentes probados, con valores de CE₅₀ de entre 274 pM a 39 pM como se muestra en la Tabla 11. Se probaron once anticuerpos anti-IL-33 usando PBMC de los donantes n.º 603486 y n.º 603487, mientras que se probaron 3 anticuerpos anti-IL-33 con PBMC del donante n.º 603491. Los 11 anticuerpos anti-IL-33 probados en los donantes n.º 603486 y n.º 603487 bloquearon la liberación de IFNγ de las PBMC humanas inducidas por la IL-33 260 pM, con valores de CI₅₀ que varían de 175 pM a 22 nM, como se muestra en la Tabla 12. Ninguno de los tres anticuerpos IL-33 probados en el donante n.º 603491 bloqueó la liberación de IFNγ de las PBMC humanas inducida por hIL-33 260 pM y, en cambio, causó un aumento de la liberación de IFNγ con valores de CE₅₀ de entre 56,1 pM y 189 nM.

Tabla 11: hIL-33 indujo la liberación de IFNγ a partir de PBMC humanas de tres donantes.

[IL-33]	Donante 603486	Donante 603487	Donante 603491
CE ₅₀ (M)	1,101 x 10 ⁻¹⁰	3,878 x 10 ⁻¹¹	2,739 x 10 ⁻¹⁰

Tabla 12: Anticuerpos anti-IL-33 que bloquean la liberación de IFN- γ inducida por IL-33 de PBMC humanas del donante n.º 603486 y n.º 603487

Anticuerpo	CI ₅₀ (M) del donante n.º 603486	CI ₅₀ (M) del donante n.º 603487
H4H9629P	8,154 x 10 ⁻¹⁰	5,205 x 10 ⁻⁹
H4H9640P	4,419 x 10 ⁻⁹	1,224 x 10 ⁻⁸
H4H9659P	1,252 x 10 ⁻⁹	2,710 x 10 ⁻⁹
H4H9660P	6,669 x 10 ⁻¹⁰	2,913 x 10 ⁻⁹
H4H9662P	9,640 x 10 ⁻¹⁰	3,021 x 10 ⁻⁹
H4H9663P	1,236 x 10 ⁻⁸	2,203 x 10 ⁻⁸
H4H9664P	3,984 x 10 ⁻⁹	6,081 x 10 ⁻⁹
H4H9665P	1,044 x 10 ⁻⁸	2,337 x 10 ⁻⁸
H4H9667P	8,066 x 10 ⁻⁹	1,876 x 10 ⁻⁸
H4H9671P	2,968 x 10 ⁻⁹	8,622 x 10 ⁻⁹
H4H9675P	1,754 x 10 ⁻¹⁰	4,715 x 10 ⁻¹⁰

Tabla 13: Anticuerpos anti-IL-33 que bloquean la liberación de IFN- γ inducida por IL-33 de PBMC humanas del donante n.º 603491.

Anticuerpo	CI ₅₀ (M) del donante n.º 603491
H1M9559N	no bloqueante
H1M9566N	no bloqueante
H1M9568N	no bloqueante

El alcance de la presente invención no debe limitarse a las realizaciones específicas descritas en el presente documento. De hecho, a partir de la descripción anterior y de las figuras adjuntas, diversas modificaciones de la invención, además de las descritas en este documento, serán obvias para los expertos en la materia. Se pretende incluir dichas modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 9. Competitividad cruzada de IL-33 humana usando interferometría de biocapa

Se determinó la competitividad de unión entre un panel de diferentes anticuerpos monoclonales anti-IL-33 usando un ensayo de interferometría de biocapa, en tiempo real, sin marcador en un biosensor Octet® HTX (ForteBio, una filial de Pall Life Sciences). El experimento se realizó a 25 °C usando un tampón de HEPES 0,01 M a pH 7,4, NaCl 0,15 M, Tensioactivo Tween-20 al 0,05 % v/v y 0,1 mg/ml de BSA (tampón cinético HBS-ET) agitando la placa a una velocidad de 1.000 rpm. Para evaluar si dos anticuerpos pudieron competir entre sí para unirse a la IL-33 humana, se usó un formato de ensayo de mezcla previa donde se mezclaron previamente 100 nM de IL-33 humana (R&D Systems; n.º 3625-IL-010/CF) con 500 nM de diferentes anticuerpos monoclonales anti-IL-33 (posteriormente denominados mAb-2) durante al menos 2 horas antes de ejecutar el ensayo de competición de unión. Biosensores Octet recubiertos con un anticuerpo policlonal anti-Fc de ratón (Pall ForteBio Corp., n.º 18-5088; denominado en lo sucesivo AMC) o con un anticuerpo policlonal anti-Fc humano (Pall ForteBio Corp., n.º 18-5060; denominado en lo sucesivo AHC) se sumergieron primero en pocillos que contenían 20 mg/ml de anticuerpos monoclonales anti-IL-33 individuales durante 3 minutos para capturar anticuerpos monoclonales anti-IL-33 expresados ya sea con Fc de ratón o con Fc humano, respectivamente (posteriormente denominados mAb-1). Después de la etapa de captura, el anticuerpo policlonal anti-Fc de ratón no ocupado y el anticuerpo policlonal anti-Fc humano de los biosensores Octet se saturaron sumergiéndolos durante 4 minutos en pocillos que contenían 200 mg/ml de un anticuerpo monoclonal no específico con un Fc de ratón o con un Fc humano, respectivamente. Finalmente, los biosensores Octet se sumergieron durante 4 minutos en pocillos que contenían las muestras previamente mezcladas de 100 nM de IL-33 humana y 500 nM de mAb-2. Al final de cada ciclo, se eliminaron los anticuerpos anti-IL-33 capturados de forma no covalente junto con el complejo previo unido de IL-33 y mAb-2 humanos de los biosensores usando tres inmersiones alternativas de 20 segundos en HCl 10 mM, seguidas de inmersión en el tampón cinético HBS-ET. Los biosensores se lavaron en tampón cinético HBS-ET entre cada etapa del experimento. La respuesta de unión en tiempo real se controló durante las uniones, y se registró la respuesta de unión (en unidades de nm) al final de cada etapa. Durante el análisis, la señal de enlace de fondo de uno mismo para un mAb-2 dado (donde mAb-1 = mAb-2, es decir, a lo largo de la diagonal de la matriz) se sustrajo de la señal observada para todas las uniones de mAb-2 (a través de una columna en la matriz de competitividad cruzada), y los resultados corregidos en el fondo se muestran en la Figura 1. Se midió la respuesta de la unión de mAb-1 al complejo previo de IL-33 humana y cada una de las diferentes muestras de mAb-2 para determinar el comportamiento competitivo/no competitivo de diferentes anticuerpos monoclonales anti-IL-33 entre sí.

Como se muestra en la Figura 1, los recuadros de color gris claro con fuente de color negro representan una respuesta de unión para la autocompetitividad. Los anticuerpos que compiten entre sí en ambas direcciones, independientemente del orden de unión, se representan con recuadros de color negro y fuente de color blanco. Las celdas resaltadas en gris oscuro con fuente de color negro representan el anticuerpo monoclonal anti-IL-33 que se une débilmente a la IL-33 humana, dando lugar a una competitividad cruzada unidireccional observada. Los controles de isotipo usados en el experimento están representados por recuadros de color gris oscuro con fuente de color blanco. Los recuadros de color blanco con fuente de color negro no representan competitividad entre anticuerpos, lo que sugiere que cada anticuerpo tiene un epítipo de unión distinto.

Ejemplo 10. Competitividad cruzada de IL-33 de mono usando interferometría de biocapa

Se determinó la competitividad de unión entre un panel de diferentes anticuerpos monoclonales anti-IL-33 usando un ensayo de interferometría de biocapa, en tiempo real, sin marcador en un biosensor Octet® HTX (ForteBio, una filial de Pall Life Sciences). El experimento se realizó a 25 °C usando un tampón de HEPES 0,01 M a pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Tensioactivo Tween-20 al 0,05 % v/v y 0,1 mg/ml de BSA (tampón cinético HBS-ET) agitando la placa a una velocidad de 1.000 rpm. Para evaluar si dos anticuerpos pudieron competir entre sí para unirse a la IL-33 de mono recombinante expresada con un marcador de hexahistidina C-terminal (MfIL-33-6His; SEQ ID: 305), se capturaron primero aproximadamente 0,15 nm de unidades de unión de MfIL-33-6His en biosensores Octet recubiertos con anticuerpo anti-penta-His (ForteBio Inc, n.º 18-5079) sumergiendo los biosensores durante 85 segundos en pocillos que contenían 2 mg/ml de MfIL-33-6His. Los biosensores capturados con antígeno se saturaron con un primer anticuerpo monoclonal anti-IL-33 (posteriormente denominado mAb-1) mediante la inmersión en pocillos que contenían una solución de 50 mg/ml de mAb-1 durante 5 minutos. Los biosensores se sumergieron luego en pocillos que contenían una solución de 50 mg/ml de un segundo anticuerpo monoclonal anti-IL-33 (posteriormente denominado mAb-2) durante 4 minutos. Los biosensores se lavaron en tampón cinético HBS-ET entre cada etapa del experimento. La respuesta de unión en tiempo real se controló durante el experimento, y se registró la respuesta de unión máxima para cada etapa de unión. Se midió la respuesta de unión de mAb-2 a MfIL-33-6His complejado previamente con mAb-1, y se determinó el comportamiento competitivo/no competitivo de diferentes anticuerpos monoclonales anti-IL-33 entre sí.

Como se muestra en la Figura 2, los recuadros de color gris claro con fuente de color negro (a lo largo de una diagonal) representan la autocompetitividad (donde mAb-1 = mAb-2). Los anticuerpos que compiten en ambas direcciones, independientemente del orden de unión, se representan con recuadros de color negro y fuente de color blanco. Los recuadros de color blanco con fuente de color negro no representan competitividad entre anticuerpos, lo que sugiere que cada anticuerpo tiene un epítipo de unión distinto. Los recuadros de color gris oscuro con fuente de color blanco representan el control de isotipo usado en el experimento.

EJEMPLO 11. Prueba de mAb en el modelo *in vivo*; Modelo de inflamación pulmonar aguda inducida por HDM para estudiar el papel de IL-33 en la inflamación pulmonar

Para determinar el efecto de un anticuerpo anti-IL-33, H4H9675P, en un modelo relevante *in vivo*, se realizó un estudio de inflamación pulmonar aguda inducida por HDM en ratones que eran homocigotos para la expresión de IL-33 humana en lugar de IL-33 de ratón (ratones Humln de IL-33).

Se administraron a ratones Humln de IL-33 por vía intranasal 50 mg de extracto de ácaros del polvo doméstico (HDM; Greer,

n.º XPB70D3A2.5) diluido en 20 ml de solución salina tamponada con fosfato x1 (PBS) (n = 17) o 20 ml de PBS x1 (n = 3) durante 5 días a la semana durante 2 semanas. Se inyectaron por vía subcutánea a un subconjunto de los ratones expuestos a HDM 25 mg/kg de un anticuerpo anti-IL-33, H4H9675, (n = 6) o un anticuerpo de control de isotipo (n = 6) comenzando tres días antes de la primera administración de HDM, y luego dos veces a la semana hasta el final de la exposición a HDM. El día 15 después del primer HDM intranasal, todos los ratones fueron sacrificados y se extrajeron los pulmones. La dosificación experimental y el protocolo de tratamiento para los grupos de ratones se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14: Protocolo experimental de dosificación y tratamiento para grupos de ratones

Grupo	Ratones	Exposición intranasal	Duración de la exposición intranasal	Anticuerpo
1	Ratones Humln de IL-33	PBS x1	2 semanas	Ninguno
2	Ratones Humln de IL-33	50 mg de HDM en 20 ml de PBS x1	2 semanas	Ninguno
3	Ratones Humln de IL-33	50 mg de HDM en 20 ml de PBS x1	2 semanas	Control de isotipo
4	Ratones Humln de IL-33	50 mg de HDM en 20 ml de PBS x1	2 semanas	Anticuerpo anti-IL-33 (H4H9675)

Extracción de los pulmones para el análisis de citocinas:

Después del desangrado, se extrajeron los lóbulos craneales y medios del pulmón derecho de cada ratón y se colocaron en tubos que contenían una solución de reactivo de extracción de proteína tisular (reactivo T-PER x1; Pierce, n.º 78510) complementado con cóctel inhibidor de la proteasa Halt x1 (Pierce, n.º 78430). Todas las etapas adicionales se realizaron en hielo. Se ajustó el volumen de reactivo T-PER (que contenía el cóctel inhibidor de la proteasa) para cada muestra para que coincidiera con una proporción de 1:8 (p/v) de tejido con respecto a T-PER. Las muestras de

pulmón se homogeneizaron manualmente en los tubos, usando morteros desechables (Kimble Chase, n.º 749625-0010). Los lisados resultantes se centrifugaron para formar restos de sedimentos. Se transfirieron los sobrenadantes que contenían los extractos de proteínas solubles a tubos recién preparados y se almacenaron a 4 °C hasta su posterior análisis.

El contenido de proteína total de los extractos de proteína pulmonar se midió usando un ensayo de Bradford. Para el ensayo, se sembraron 10 ml de muestras de extracto diluido en placas de 96 pocillos por duplicado y se mezclaron con 200 µl de reactivo colorante x1 (Biorad, n.º 500-0006). Se usaron diluciones en serie de albúmina de suero bovino (Sigma, n.º A7979), comenzando a 700 mg/ml en reactivo T-Per x1 como patrón para determinar la concentración exacta de proteína de los extractos. Tras una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas Molecular Devices SpectraMax M5. Se realizó un análisis de datos para determinar el contenido total de proteínas usando el programa informático GraphPad Prism™.

Se midieron las concentraciones de citocinas en los extractos de proteínas pulmonares usando un kit de inmunoensayo multiplex (para ratón) Proinflammatory Panel 1 (MesoScale Discovery, n.º K15048D-2), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se añadieron 50 µl/pocillo de calibradores y muestras (diluidas en el Diluyente 41) a placas previamente recubiertas con anticuerpos de captura y se incubaron a temperatura ambiente mientras se agitaban a 700 rpm durante 2 horas. Las placas se lavaron 3 veces con PBS x1 que contenía Tween-20 al 0,05 % (p/v), seguido de la adición de 25 µl de solución de detección de anticuerpos diluida en Diluyente 45. Después de otras 2 horas de incubación a temperatura ambiente mientras se agitaba, se lavó la placa 3 veces y se añadieron 150 µl de tampón de lectura x2 a cada pocillo. La electroquimioluminiscencia se leyó inmediatamente en un instrumento MSD Spector®. El análisis de datos se realizó usando el programa informático GraphPad Prism™.

Se normalizó cada concentración de citocina en extractos de proteína total pulmonar de todos los ratones de cada grupo con respecto al contenido de proteína total de los extractos medidos mediante el ensayo de Bradford, y se expresó para cada grupo como pg promedio de citocina por mg de proteínas pulmonares totales (pg/mg de proteína pulmonar, ± DT) como se muestra en la Tabla 15.

Extracción de los pulmones para el análisis de citocinas:

El nivel de las citocinas IL-4 e IL-5 liberadas en los pulmones de los ratones Humln de IL-33 que recibieron HDM durante 2 semanas fue significativamente mayor que en los ratones Humln de IL-33 expuestos a tampón salino. En cambio, hubo una tendencia hacia niveles reducidos de IL-4 e IL-5 en los pulmones de ratones Humln de IL-33 tratados con anticuerpo anti-IL-33 en el transcurso de la exposición a HDM aguda en comparación con los ratones Humln de IL-33 que recibieron HDM sin tratamiento o con control de isotipo.

Tabla 15: Concentración de citocinas en extractos de proteína pulmonar

Grupo experimental	Media [IL-4] en extractos de proteína pulmonar (pg/mg de proteína pulmonar) (± DT)	Media [IL-5] en extractos de proteína pulmonar (pg/mg de proteína pulmonar) (± DT)
1. Exposición a PBS x1 (n = 3)	0,01 (± 0,01)	0,03 (± 0,01)
2. Exposición a HDM (n = 5)	1,77 (±1,63)*	4,72 (±4,14)**
3. Exposición a HDM + Anticuerpo de control de isotipo (n = 6)	0,79 (±0,52)*	2,03 (±1,05) *
4. Exposición a HDM + H4H9675P (n = 6)	0,30 (± 0,18)	0,81 (± 0,67)
Nota: Se indica la significación estadística determinada mediante ANOVA unidireccional de Kruskal-Wallis con la prueba post-hoc de comparación múltiple de Dunn (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, en comparación con el Grupo 1: Ratones Humln de IL-33, exposición a solución salina).		

Extracción de pulmones para análisis de infiltrado de células pulmonares

Después del desangrado, se extrajo el lóbulo caudal del pulmón derecho de cada ratón, se cortó en cubos de aproximadamente 2 a 3 mm de tamaño, y luego se colocaron en un tubo que contenía una solución de 20 mg/ml de DNase (Roche, n.º 10104159001) y 0,7 U/ml de Liberase TH (Roche, n.º 05401151001) diluidos en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) (Gibco, n.º 14025), que se incubó en un baño de agua a 37 °C durante 20 minutos y se agitó con formación de vórtice cada 5 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de ácido etilendiaminotetraacético (Gibco, n.º 15575) a una concentración final de 10 mM. Posteriormente, se disoció cada pulmón con un disociador gentleMACS® (Miltenyi Biotec, n.º 130-095-937), luego se filtró a través de un filtro de 70 µm y se centrifugó. Se volvió a suspender el sedimento pulmonar resultante en 1 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos x1 (Sigma, n.º R7757) para eliminar los glóbulos rojos. Tras la incubación durante 3 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 3 ml de DMEM x1 para desactivar el tampón de lisis de glóbulos rojos. Las suspensiones celulares se centrifugaron y los sedimentos celulares resultantes se volvieron a suspender en 5 ml de tampón MACS (tampón de ejecución autoMACS; Miltenyi Biotec, n.º 130-091-221). Las muestras resuspendidas se filtraron a través

- de un filtro de 70 mm y se colocaron a 1×10^6 células por pocillo en una placa de fondo en V de 96 pocillos. Luego se centrifugaron las células y se lavaron los sedimentos en PBS x1. Tras una segunda centrifugación, se volvieron a suspender los sedimentos celulares en 100 ml de tinción de células muertas Fixable Aqua LIVE/DEAD® (Life Technologies, n.º L34957) diluida a 1:1000 en PBS x1 para determinar la viabilidad celular y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente mientras se protegían de la luz. Después de un lavado en PBS x1, las células se incubaron en una solución de tampón MACS que contenía 10 mg/ml de bloque de rata anti-Fc CD16/CD32 de ratón purificado, (Clon: 2.4G2; BD Biosciences, n.º 553142) durante 10 minutos a 4 °C. Las células se lavaron una vez y luego se incubaron en la mezcla de anticuerpos apropiada (descrita en la Tabla 16) diluida en tampón MACS durante 30 minutos a 4 °C mientras se protegía de la luz. Después de la incubación de anticuerpos, las células se lavaron dos veces en tampón MACS, se volvieron a suspender en BD cytofix (BD Biosciences, n.º 554655) y luego se incubaron durante 15 minutos a 4 °C mientras se protegían de la luz. Después, se lavaron las células, se volvieron a suspender en tampón MACS, y luego se transfirieron a tubos BD FACS (BD Biosciences, n.º 352235) para el análisis de eosinófilos, célula linfoide innata de tipo 2 (ILC2) y linfocitos mediante citometría de flujo.
- Los linfocitos T CD4 activados se definieron como células que estaban vivas, CD45⁺, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁺, CD8⁻ y CD69⁺. Los linfocitos B activados se definieron como células que estaban vivas, CD45⁺, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁺, CD19⁺ y CD69⁺. Los eosinófilos se definieron como eosinófilos vivos, CD45⁺, GR1⁻, CD11c^{Lo}, SiglecF^{hi}. Las células ILC2 se definieron como células vivas, CD45⁺, Linaje-(Linaje: CD19, CD3, CD11b, CD11c, F4/80), CD127⁺, Sca-1⁺, ST2⁺. Los datos para las células CD4 activadas, expresados como frecuencia de células activadas (CD69⁺) dentro de la población parental (CD4, $\pm$ DT), se muestran en la Tabla 17.

Tabla 16: Anticuerpos usados para el análisis de citometría de flujo

Anticuerpo	Fluorocromo	Fabricante	Numero de catalogo	Dilución final
CD11c	APC	BD Biosciences	550261	1/100
CD45	PerCP Cy5.5	eBiosciences	45-0454-82	1/800
F4/80	Pacific Blue	eBiosciences	48-4801-82	1/200
Siglec-F	PE	BD Biosciences	552126	1/100
Ly6G (Gr-1)	APC-eFluor780	eBiosciences	47-5931-82	1/200
CD3	PE-Cy7	BD Biosciences	552774	1/200
CD19	eFluor 450	eBiosciences	48-0193-82	1/200
CD4	APC-H7	BD Biosciences	560181	1/200
CD8	APC	eBiosciences	17-0081-82	1/200
CD69	PE	eBiosciences	12-0691-82	1/200
CD3	eFluor450	eBiosciences	48-0031-82	1/200
CD11b	eFluor450	eBiosciences	40-0112-82	1/100
CD11c	eFluor450	eBiosciences	48-0114-82	1/100
CD127	APC-eFluor780	eBiosciences	47-1271-82	1/200
Sca-1	FITC	BD Biosciences	557405	1/200
ST2	APC	Biolegend	145306	1/200

Análisis de infiltrado de células pulmonares:

- Como se muestra en la Tabla 17, la frecuencia de los linfocitos T CD4⁺ activados, los eosinófilos e ILC2 en los pulmones de los ratones HumIn de IL-33 que recibieron HDM durante 2 semanas fue significativamente mayor que la de los ratones HumIn de IL-33 expuestos al control de PBS x1. En cambio, se observó una tendencia hacia una frecuencia reducida de estos infiltrados en los ratones HumIn de IL-33 cuando se trataron con el anticuerpo anti-IL-33 en el transcurso de la exposición a HDM aguda en comparación con ratones HumIn de IL-33 que habían recibido HDM sin tratamiento o con control de isotipo.

- Se observó una tendencia hacia un aumento en la frecuencia de los linfocitos B activados en los pulmones de ratones HumIn de IL-33 expuestos a HDM durante 2 semanas en comparación con los ratones Hmln de IL33 expuestos a control de PBS x1. Tras el tratamiento con anticuerpos anti-IL-33, se observó una reducción significativa en la frecuencia de los linfocitos B activados pulmonares en los pulmones de ratones HumIn de IL-33 expuestos a HDM, en comparación con los ratones HumIn de IL-33 que recibieron HDM sin tratamiento o con control de isotipo.

Tabla 17: Frecuencia de infiltrado de células pulmonares según lo determinado mediante citometría de flujo

Grupo experimental	Frecuencia media de linfocitos T CD4 ⁺ activados en población CD4 ⁺ ($\pm$ DT)	Frecuencia media de linfocitos B activados en la población de linfocitos B ($\pm$ DT)	Frecuencia media de eosinófilos en la población CD45 ⁺ ($\pm$ DT)	Frecuencia media de ILC2 en población linfoide ($\pm$ DT)
1. Exposición a PBS x1 (n = 3)	6,17 ($\pm$ 0,59)	6,85 ($\pm$ 3,09)	2,55 ($\pm$ 0,79)	0,33 ($\pm$ 0,05)

(continuación)

Grupo experimental	Frecuencia media de linfocitos T CD4+ activados en población CD4+ ($\pm$ DT)	Frecuencia media de linfocitos B activados en la población de linfocitos B ($\pm$ DT)	Frecuencia media de eosinófilos en la población CD45+ ($\pm$ DT)	Frecuencia media de ILC2 en población linfóide ($\pm$ DT)
2. Exposición a HDM (n = 5)	29,52 ($\pm$ 8,57)*	10,13 ($\pm$ 3,30)	17,28 ($\pm$ 3,97)*	1,15 ($\pm$ 0,37)*
3. Exposición a HDM + Anticuerpo de control de isotipo (n = 6)	29,68 ($\pm$ 9,84)*	11,01 ($\pm$ 2,31)	19,19 ($\pm$ 11,55)*	1,57 ($\pm$ 0,78)*
4. Exposición a HDM + H4H9675P (n = 6)	16,38 ($\pm$ 3,30)	4,88 ($\pm$ 1,70) †	10,32 ($\pm$ 4,63)	0,53 ($\pm$ 0,12)

Nota: Se indica la significación estadística determinada mediante ANOVA unidireccional de Kruskal-Wallis con la prueba post-hoc de comparación múltiple de Dunn (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, en comparación con los grupos 1: Ratones Humln de IL-33, Exposición a solución salina; † $p < 0,05$, en comparación con el grupo 3: Ratones Humln de IL-33, Exposición a HDM de 2 semanas + anticuerpo de control de isotipo).

EJEMPLO 12: Prueba de mAb en modelo *in vivo*; Modelo de fibrosis crónica inducida por HDM e inflamación pulmonar grave para estudiar el papel de IL-33 en la inflamación pulmonar

- 5 Para determinar el efecto de un anticuerpo anti-IL-33, H4H9675P, en un modelo relevante *in vivo*, Se realizó un estudio de fibrosis crónica inducida por HDM e inflamación pulmonar grave en ratones homocigotos para la expresión de IL-33 humana en lugar de IL-33 de ratón (ratones Humln de IL-33).

- 10 Se administraron a ratones Humln de IL-33 por vía intranasal 50 mg de extracto de ácaros del polvo doméstico (HDM; Greer, n.º XPB70D3A2.5) diluidos en 20 ml de solución salina tamponada con fosfato x1 (PBS) o 20 ml de PBS x1 durante 5 días a la semana durante 12 semanas. Se administraron a un segundo grupo de control de ratones Humln de IL-33 50 mg de extracto de HDM diluidos en 20 ml de PBS x1 durante 5 días a la semana durante 4 semanas, para evaluar la gravedad de la enfermedad al inicio del tratamiento con anticuerpos. Se inyectaron a dos grupos de ratones expuestos a HDM por vía subcutánea 25 mg/kg de un anticuerpo anti-IL-33, H4H9675P o un anticuerpo de control de isotipo comenzando tras 4 semanas de la exposición a HDM y luego dos veces a la semana hasta el final de la exposición a HDM (8 semanas de tratamiento con anticuerpos). En el día 85 del estudio, todos los ratones fueron sacrificados y se extrajeron los pulmones. La dosificación experimental y el protocolo de tratamiento para los grupos de ratones se muestran en la Tabla 18.

20 **Tabla 18:** Protocolo experimental de dosificación y tratamiento para grupos de ratones

Grupo	Ratones	Exposición intranasal	Duración de la exposición intranasal	Anticuerpo
1	Ratones Humln de IL-33	PBS x1	12 semanas	Ninguno
2	Ratones Humln de IL-33	50 mg de HDM en 20 ml de PBS x1	4 semanas	Ninguno
3	Ratones Humln de IL-33	50 mg de HDM en 20 ml de PBS x1	12 semanas	Ninguno
4	Ratones Humln de IL-33	50 mg de HDM en 20 ml de PBS x1	12 semanas	Anticuerpo de control de isotipo
5	Ratones Humln de IL-33	50 mg de HDM en 20 ml de PBS x1	12 semanas	Anticuerpo anti-IL-33 (H4H9675P)

Extracción de los pulmones para el análisis de citocinas:

- 25 Después del desangrado, se extrajeron los lóbulos craneales y medios del pulmón derecho de cada ratón y se colocaron en tubos que contenían una solución de reactivo de extracción de proteína tisular (reactivo T-PER x1; Pierce, n.º 78510) complementado con cóctel inhibidor de la proteasa Halt x1 (Pierce, n.º 78430). Todas las etapas adicionales se realizaron en hielo. Se ajustó el volumen de reactivo T-PER (que contenía el cóctel inhibidor de la proteasa) para cada muestra para que coincidiera con una proporción de 1:8 (p/v) de tejido con respecto a T-PER. Las muestras de pulmón se homogeneizaron manualmente en los tubos, usando morteros desechables (Kimble Chase, n.º 749625-0010). Los lisados resultantes se centrifugaron para formar restos de sedimentos. Se transfirieron los sobrenadantes que contenían los extractos de proteínas solubles a tubos recién preparados y se almacenaron a 4 °C hasta su

posterior análisis.

El contenido de proteína total de los extractos de proteína pulmonar se midió usando un ensayo de Bradford. Para el ensayo, se sembraron 10 ml de muestras de extracto diluido en placas de 96 pocillos por duplicado y se mezclaron con 200 ml de reactivo colorante x1 (Biorad, n.º 500-0006). Se usaron diluciones en serie de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma, n.º A7979), comenzando a 700 mg/ml en reactivo T-Per x1 como patrón para determinar la concentración de proteína de los extractos. Tras una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas Molecular Devices SpectraMax M5. El análisis de datos para determinar el contenido total de proteína de extracto pulmonar basado en el patrón de BSA se realizó usando el programa informático GraphPad Prism™.

Se midieron las concentraciones de citocinas en los extractos de proteínas pulmonares usando un kit de inmunoensayo multiplex (para ratón) Proinflammatory Panel 1 (MesoScale Discovery, n.º K15048D-2), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se añadieron 50 ml/pocillo de calibradores y muestras (diluidas en el Diluyente 41) a placas previamente recubiertas con anticuerpos de captura y se incubaron a temperatura ambiente mientras se agitaban a 700 rpm durante 2 horas. Las placas se lavaron 3 veces con PBS x1 que contenía Tween-20 al 0,05 % (p/v), seguido de la adición de 25 ml de solución de detección de anticuerpos diluida en Diluyente 45. Después de otras 2 horas de incubación a temperatura ambiente mientras se agita, se lavó la placa 3 veces y se añadieron 150 ml de tampón de lectura x2 a cada pocillo. La electroquimioluminiscencia se leyó inmediatamente en un instrumento MSD Spector®. El análisis de datos se realizó usando el programa informático GraphPad Prism.

Cada concentración de citocinas en los extractos de proteína total pulmonar de todos los ratones en cada grupo se normalizó al contenido de proteína total de los extractos medidos por el ensayo de Bradford, y se expresó para cada grupo como pg promedio de citocina por mg de proteínas pulmonares totales (pg/mg proteína pulmonar, $\pm$ DT) como se muestra en la Tabla 19.

Tabla 19: Concentración de citocinas en extractos de proteína pulmonar

Grupo experimental	Media [IL-4] en extractos de proteína pulmonar (pg/mg de proteína pulmonar) ($\pm$ DT)	Media [IL-5] en extractos de proteína pulmonar (pg/mg de proteína pulmonar) ($\pm$ DT)
1. Exposición a PBS x1, 12 semanas (n = 5)	0,03 ($\pm$ 0,01)	0,08 ($\pm$ 0,05)
2. Exposición a HDM, 4 semanas (n = 6)	2,84 ($\pm$ 2,22)*	4,44 ($\pm$ 4,00)**
3. Exposición a HDM, 12 semanas (n = 3)	7,31 ($\pm$ 3,94)**	6,23 ($\pm$ 3,81) *
4. Exposición a HDM, 12 semanas + Anticuerpo de control de isotipo (n = 2)	2,28 ($\pm$ 1,94)	3,39 ($\pm$ 3,29)
5. Exposición a HDM, 12 semanas + H4H9675P (n = 5)	0,38 ($\pm$ 0,21)	0,48 ($\pm$ 0,17)
Nota: Se indica la significación estadística determinada mediante ANOVA unidireccional de Kruskal-Wallis con la prueba post-hoc de comparación múltiple de Dunn (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, en comparación con los grupos 1: Ratones Humln de IL-33, exposición a solución salina).		

Análisis de citocinas pulmonares:

El nivel de las citocinas IL-4 e IL-5 liberadas en los pulmones de los ratones Humln de IL-33 que recibieron HDM durante 4 y 12 semanas fue significativamente mayor que en los ratones Humln de IL-33 expuestos a PBS x1. En cambio, hubo una tendencia hacia niveles reducidos de IL-4 e IL-5 en los pulmones de ratones Humln de IL-33 tratados con anticuerpo anti-IL-33 en el transcurso de la exposición a HDM crónica en comparación con los ratones Humln de IL-33 que recibieron HDM sin tratamiento o con control de isotipo.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> Anticuerpos anti-IL-33 y usos de los mismos

<130> 1850-WO

<140> TBA
<141>

<150> 61/778.687

ES 2 804 592 T3

<151> 13/03/2013

<150> 61/819.018

<151> 03/05/2013

5 <160> 323

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

10 <210> 1
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sintético

<400> 1

```

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agttatggca tgcattgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagaaa taaatactat 180
acagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatgg acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagagg 300
tatatcagca gctattatgg ggggttcgac ccctgggggc agggagccct ggtcaccgtc 360
tcctca

```

20

<210> 2
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Sintético

30 <400> 2

```

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Arg Glu Arg Tyr Ile Ser Ser Tyr Tyr Gly Gly Phe Asp Pro Trp
          100          105          110
Gly Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

35 <210> 3
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 804 592 T3

<220>
 <223> Sintético

5 <400> 3
 ggattcacct tcagtagtta tggc 24

10 <210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sintético

15 <400> 4

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5

20 <210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sintético

25 <400> 5
 atatggtatg atggaagaaa taaa 24

30 <210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 6

Ile Trp Tyr Asp Gly Arg Asn Lys
 1 5

40 <210> 7
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintético

50 <400> 7
 gcgagagaga ggtatcag cagctattat ggggggttcg acccc 45

55 <210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Sintético

60 <400> 8

ES 2 804 592 T3

Ala Arg Glu Arg Tyr Ile Ser Ser Tyr Tyr Gly Gly Phe Asp Pro
1 5 10 15

5 <210> 9
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 9

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgct gggcgagtca ggggtattagt agttgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaggctct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccattcac tttcggccct 300
gggaccaaac tggatatcaa g 321

15 <210> 10
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 10

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

100

105

30 <210> 11
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

35 <400> 11
cagggtatta gtagtgg

18

ES 2 804 592 T3

5	<210> 12 <211> 6 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético <400> 12	Gln Gly Ile Ser Ser Trp 1 5
15	<210> 13 <211> 9 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético <400> 13 gctgcatcc	 9
25	<210> 14 <211> 3 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético <400> 14	 Ala Ala Ser 1
35	<210> 15 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético <400> 15 caacaggcta acagttccc attcact	 27
45	<210> 16 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético <400> 16	 Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe Thr 1 5

ES 2 804 592 T3

<210> 17
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintético

<400> 17

10

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagac ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagc agctatgccg tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attagtggta gtggaagtag cacagactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatt tccagagaca attccaggga cacgctgcat 240
ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaacgttc 300
tactacttct acggtttgga cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctcctca 357
```

<210> 18
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Sintético

<400> 18

20

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

<210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Sintético

30

<400> 19
 ggattcacct tcagcagcta tgcc

35

24

<210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>

ES 2 804 592 T3

<223> Sintético

<400> 20

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

5

<210> 21

<211> 24

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

15

<400> 21

attagtggta gtgaagtag caca

24

<210> 22

<211> 8

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

25

<400> 22

Ile Ser Gly Ser Gly Ser Ser Thr
1 5

30

<210> 23

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Sintético

<400> 23

gcgaaaacgt tctactactt ctacggttg gacgtc

36

40

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Sintético

<400> 24

50

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

<210> 25

<211> 321

55

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 804 592 T3

<220>
<223> Sintético

<400> 25

5

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctttaagaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcgagtc gggcattagc aattatttag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagtgc ctaaggtcct aatctatgct gcatccactt tgcaatcagg ggtcccatct 180
cggttcagtg gcagtggatc tgggacagtt ttcactctca ccatcagcag cctgcagact 240
gaagatgttg caacttatta ctgtcaaaag tatagcagtg cccattcac tttcggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa a 321
```

<210> 26
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Sintético

15

<400> 26

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

<210> 27
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 27
cagggcatta gcaattat

18

30

<210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Sintético

<400> 28

40

ES 2 804 592 T3

Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
1 5

5 <210> 29
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 29
gctgcatcc 9

15 <210> 30
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 30

Ala Ala Ser
1

25 <210> 31
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

35 <400> 31
caaaagtata gcagtgcacc attcact 27

40 <210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

45 <400> 32

Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Phe Thr
1 5

50 <210> 33
<211> 351
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Sintético

<400> 33

ES 2 804 592 T3

```

caggtgcttc tggtagagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggccac agtgaaggtc 60
tcttgcaagg cttctggatc cactttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acaatgggtg cacaactat 180
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggaattga gcaggctgag atctgacgac acggccgtat attactgtgc gagagagttg 300
cgggtataact ggaagtcctg gggccaggga accctgggtca ccgtctcctc a 351

```

<210> 34
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 34

```

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

```

<210> 35
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 35
 ggatccactt tcaccggcta ctat

24

<210> 36
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 36

```

Gly Ser Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr
 1          5

```

<210> 37
 <211> 24

ES 2 804 592 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintético
 5
 <400> 37
 atcaacccta acaatggtgg caca 24
 10
 <210> 38
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Sintético
 <400> 38
 Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr
 1 5
 20
 <210> 39
 <211> 30
 <212> ADN
 25
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintético
 30
 <400> 39
 gcgagagagt tgcggtataa ctggaagtcc 30
 <210> 40
 <211> 10
 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintético
 40
 <400> 40
 Ala Arg Glu Leu Arg Tyr Asn Trp Lys Ser
 1 5 10
 45
 <210> 41
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Sintético
 <400> 41
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagtcacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtggtggc aggcctact tagcctggta ccaacagata 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tgacatcca 180
 gacagggttca gtggcaatgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag tagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatgata attcccctta tacttttggc 300
 caggggacaa ggctggagat caaa 324
 55

ES 2 804 592 T3

5	<210> 42 <211> 108 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
10	<400> 42	
	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly 1 5 10 15 Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Arg Pro 20 25 30 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu 35 40 45 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Asp Ile Pro Asp Arg Phe Ser 50 55 60 Gly Asn Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu 65 70 75 80 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Ser Pro 85 90 95 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys 100 105	
15	<210> 43 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintético	
	<400> 43	
	cagagtgttg gcaggcccta c	21
25	<210> 44 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sintético	
	<400> 44	
35		Gln Ser Val Gly Arg Pro Tyr 1 5
40	<210> 45 <211> 9 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
45	<400> 45	
	ggtgcatcc	9

5 <210> 46
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

10 <400> 46

Gly Ala Ser
1

15 <210> 47
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 47
cagcagtatg ataattcccc ttatact

27

25 <210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

<400> 48

Gln Gln Tyr Asp Asn Ser Pro Tyr Thr
1 5

35 <210> 49
<211> 366
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

45 <400> 49

```
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacaac ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttaga agctttgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggaatt ggtctcagat ctcaggacta gtggtggtag tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gctcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaattga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaagccac 300
tatagcacca gctggttcgg gggctttgac tactgggggc agggaaccct ggtcactgtc 360
tcctca 366
```

50 <210> 50
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

5 <400> 50

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

10 <210> 51
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sintético

<400> 51
ggattcacct ttagaagctt tgcc 24

20 <210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Sintético

<400> 52

Gly	Phe	Thr	Phe	Arg	Ser	Phe	Ala
1				5			

30

35 <210> 53
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

40 <400> 53
ctcaggacta gtggtgtag taca 24

<210> 54
<211> 8

ES 2 804 592 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Sintético

<400> 54

Leu Arg Thr Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

10 <210> 55
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sintético

<400> 55
20 gcgaaaagcc actatagcac cagctgggtc gggggctttg actac 45

<210> 56
<211> 15
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

30 <400> 56

Ala Lys Ser His Tyr Ser Thr Ser Trp Phe Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5 10 15

35 <210> 57
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sintético

<400> 57

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgctt ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggtttttagc agctggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcaccaa cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctctcac ttcgggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

45 <210> 58
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Sintético

ES 2 804 592 T3

<400> 58

```

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

```

5 <210> 59
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 59
 cagggtttta gcagctgg 18

15 <210> 60
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

25 <400> 60

```

Gln Gly Phe Ser Ser Trp
 1      5

```

30 <210> 61
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Sintético

<400> 61
 gctgcatcc 9

40 <210> 62
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintético

<400> 62

Ala Ala Ser
1

5 <210> 63
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 63
caacaggcta acagttccc tctcact 27

15 <210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 64

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

25
30 <210> 65
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

35 <400> 65

gaggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	ttggtacagc	ctgggggggc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	cacgttttagc	agctatgtca	tgagctgggt	ccgccaggct	120
ccagggaagg	ggctggagtg	ggtctcaagt	attagtggta	atgggtgtag	cacaaactac	180
gcagactccg	tgaaggggccg	gttcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgttt	240
ctggaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acggccgtat	attactgtgc	gaaatcactg	300
ggaactacca	cgactttttt	gggggtttgac	tattggggcc	agggaaccct	ggtcaccgtc	360
tcctca						366

40 <210> 66
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 66

ES 2 804 592 T3

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

<210> 67
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 67
 ggattcacgt ttagcagcta tgtc 24

<210> 68
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 68

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Val
1				5			

<210> 69
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 69
 attagtggta atggtgtag caca 24

<210> 70
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

ES 2 804 592 T3

<400> 70

Ile Ser Gly Asn Gly Gly Ser Thr
1 5

5 <210> 71
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 71
gcgaaatcac tgggaactac cacgactttt ttggggttg actat 45

15 <210> 72
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 72

25 Ala Lys Ser Leu Gly Thr Thr Thr Thr Phe Leu Gly Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 73
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

35 <400> 73

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggatttagc agctggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacatat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctctcac ttcgggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

40 <210> 74
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 74

ES 2 804 592 T3

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

<210> 75
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 75
 cagggtatta gcagctgg 18

<210> 76
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 76

Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Trp
1				5	

<210> 77
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 77
 gctgcatcc 9

<210> 78
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 78

ES 2 804 592 T3

Ala Ala Ser
1

5 <210> 79
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 79
caacaggcta acagttccc tctcact 27

15 <210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 80

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

25 <210> 81
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

35 <400> 81

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttattact ggagctggat ccggcagccc 120
ccagggaagg gactggagtt gattgggtat atttattaca gtgggagcac caattataac 180
ccctccctca agagtcgagt caccatatct gtagacacgt ccaagaacca cttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtatatt actgtgcgag atcccagtat 300

accagtagtt ggtacggttc ttttgatata tggggccaag ggacaatggt caccgtctct 360
tca 363

40 <210> 82
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 82

ES 2 804 592 T3

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

<210> 83
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 83
 ggtggctcca tcagtagtta ttac 24

<210> 84
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 84

Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr	Tyr
1				5			

<210> 85
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 85
 atttattaca gtgggagcac c 21

<210> 86
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 86

ES 2 804 592 T3

Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr
1 5

5 <210> 87
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 87
gcgagatccc agtataccag tagttggtac ggttctttg atatc 45

15 <210> 88
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 88

Ala Arg Ser Gln Tyr Thr Ser Ser Trp Tyr Gly Ser Phe Asp Ile
1 5 10 15

25 <210> 89
<211> 321
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

35 <400> 89

```
gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggatttagc acctggtag cctggtttca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tacaagggtg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggccagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccgtggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321
```

40 <210> 90
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 90

ES 2 804 592 T3

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

<210> 91
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 91
 cagggtatta gcacctgg 18

<210> 92
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 92

Gln	Gly	Ile	Ser	Thr	Trp
1				5	

<210> 93
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 93
 gctgcatcc 9

<210> 94
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 94

ES 2 804 592 T3

Ala Ala Ser
1

5 <210> 95
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 95
caacaggcta acagttccc gtggacg 27

15 <210> 96
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 96

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp Thr
1 5

25 <210> 97
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

35 <400> 97

caggttcagc	tgggtgcagtc	tggagctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcttgcaagg	cctctgggta	cacctttaac	agctatggta	tcagctgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggatgg	atcagctccc	acaatggtaa	cagtcactat	180
gtacagaagt	tccagggcag	agtctccatg	accacagaca	catccacgag	tacagcctac	240
atggaaactga	ggagccttag	atctgacgac	acggccgtgt	attactgtgc	gagacactcg	300
tataccacca	gctggtacgg	gggttttgac	tattggggcc	agggaaccct	ggtcaccgtc	360
tctca						366

40 <210> 98
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 98

ES 2 804 592 T3

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

<210> 99
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 99
 gggtacacct ttaacagcta tggt 24

<210> 100
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 100

Gly	Tyr	Thr	Phe	Asn	Ser	Tyr	Gly
1				5			

<210> 101
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 101
 atcagctccc acaatggtaa cagt 24

<210> 102
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

ES 2 804 592 T3

<400> 102

Ile Ser Ser His Asn Gly Asn Ser
1 5

5 <210> 103
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 103
gcgagacact cgtataccac cagctggtac gggggtttg actat 45

15 <210> 104
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

25 <400> 104

Ala Arg His Ser Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5 10 15

30 <210> 105
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

35 <400> 105

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtc ggggttttag agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctcagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggtcagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

40 <210> 106
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 106

ES 2 804 592 T3

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

<210> 107
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 107
 cagggtttta gcagctgg 18

<210> 108
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 108

Gln Gly Phe Ser Ser Trp
 1 5

<210> 109
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 109
 gctgcatcc 9

<210> 110
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 110

ES 2 804 592 T3

Ala Ala Ser
1

5 <210> 111
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 111
caacaggcta acagttccc tctcact 27

15 <210> 112
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 112

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

25 <210> 113
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

35 <400> 113

gaggtgcagc	tgggtggagtc	cggggggaggc	ttgggttcagc	cggggggggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggaat	caccttgagc	agctatggca	tgagctgggt	ccgccaggct	120
ccagggaagg	gactggagtg	ggtcgcaccc	atcttttggt	gtgggtgggtg	cccatactac	180
gcagactccg	tgaagggccg	gttcaccatg	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ttgcaaataa	acagcctgag	agccgaggac	acggccgtat	attattgtgc	gaaagatcga	300
tacagtggga	gctactacgg	aggttttgac	tactggggcc	ggggaaccct	ggtcaccgtc	360
tcctca						366

40 <210> 114
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 114

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

ES 2 804 592 T3

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

5 <210> 115
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 115
 ggaatcacct tgagcagcta tggc 24

15 <210> 116
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético
 <400> 116

Gly Ile Thr Leu Ser Ser Tyr Gly
 1 5

25
 30 <210> 117
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

35 <400> 117
 atttttgga gtggtggtgg ccca 24

40 <210> 118
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 118

ES 2 804 592 T3

Ile Phe Gly Ser Gly Gly Gly Pro
1 5

5
<210> 119
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> Sintético

<400> 119
gcgaaagatc gatacagtg gagctactac ggaggtttg actac 45

15
<210> 120
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> Sintético

<400> 120

Ala Lys Asp Arg Tyr Ser Gly Ser Tyr Tyr Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5 10 15

25
<210> 121
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30
<220>
<223> Sintético

35
<400> 121

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtc gggattacc agctggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctacactcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaactgg ggtcccatca 180
agggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaacattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctcctac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

40
<210> 122
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45
<220>
<223> Sintético

<400> 122

ES 2 804 592 T3

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

5 <210> 123
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 123
 cagggtatta ccagctgg 18

15 <210> 124
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 124

Gln	Gly	Ile	Thr	Ser	Trp
1				5	

25 <210> 125
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 125
 gctgcatcc 9

40 <210> 126
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

ES 2 804 592 T3

<400> 126

Ala Ala Ser
1

5

<210> 127
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Sintético

15

<400> 127
caacaggcta acagttccc tctact 27

<210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Sintético

25

<400> 128

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr
1 5

30

<210> 129
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Sintético

<400> 129

gaggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	ttggtacagc	ctgggggggtc	cctaagactc	60
tctgtgagc	cctctggatt	cacctttagc	agttatgcct	tgacctgggt	ccgccaggct	120
ccagggaagg	ggctggagtg	ggtctctttt	attagtggta	gtggtggtag	gccattctac	180
gcagactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	catgctgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acggccatat	attactgtgc	gaagtcacctg	300
tataccacca	gctggtacgg	ggggttcgac	tcttggggcc	agggaaccct	ggtcaccgtc	360
tctca						366

40

<210> 130
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Sintético

50

<400> 130

ES 2 804 592 T3

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

<210> 131
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 131
 ggattcacct ttagcagtta tgcc 24

<210> 132
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 132

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Ala
1				5			

<210> 133
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 133
 attagtggta gtggtgtag gccca 24

<210> 134
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 804 592 T3

<223> Sintético

<400> 134

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Pro
1 5

5

<210> 135

<211> 45

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

15

<400> 135

gcgaagtccc tgtataccac cagctggtac ggggggttcg actcc 45

<210> 136

<211> 15

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

25

<400> 136

Ala Lys Ser Leu Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Ser
1 5 10 15

30

<210> 137

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Sintético

<400> 137

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgct gggcgagtca ggggtgctgc agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ttgtcaacag tctaacagtt tccctttcac tctcggcct 300
gggaccaaag tggatatcaa a 321

40

<210> 138

<211> 107

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

50

<400> 138

ES 2 804 592 T3

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

Thr	Leu	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys
			100					105		

<210> 139
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 139
 cagggtgtcg tcagctgg 18

<210> 140
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 140

Gln	Gly	Val	Val	Ser	Trp
1				5	

<210> 141
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 141
 gctgcatcc 9

<210> 142
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 142

ES 2 804 592 T3

Ala Ala Ser
1

5 <210> 143
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 143
caacagtcta acagttccc ttc 24

15 <210> 144
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 144

Gln Gln Ser Asn Ser Phe Pro Phe
1 5

25 <210> 145
<211> 366
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

35 <400> 145

caggtgcagc	tgggtgcagtc	tggggctgaa	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcctgcaagg	cttctggata	caccttcacc	ggccactata	tgtactggat	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggatgg	atcaacccta	acagtgggtg	cacaaactat	180
gcacagaagt	ttcaggacag	ggtcaccatg	accagggaca	cgtccatcag	cacagcctac	240
atggagctga	gcaggctgag	atctgacgac	acggccgtgt	attactgtgc	gagagggaga	300
tatggcagta	gctggtacgg	ggggtttgag	tactggggcc	agggaaccct	ggtcaccgtc	360
tcctca						366

40 <210> 146
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 146

ES 2 804 592 T3

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

<210> 147
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 147
 ggatacacct tcaccggcca ctat 24

<210> 148
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 148

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	His	Tyr
1				5			

<210> 149
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 149
 atcaacccta acagtggtg caca 24

<210> 150
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 150

ES 2 804 592 T3

Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr
1 5

5 <210> 151
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 151
gcgagaggga gatatggcag tagctggtac gggggggttg agtac 45

15 <210> 152
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 152

Ala Arg Gly Arg Tyr Gly Ser Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Glu Tyr
1 5 10 15

25 <210> 153
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

35 <400> 153

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgttggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggattacc agctggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaacctcct gatctatgct gcagccagtt tacaaagtgg ggtcccatca 180
agggttcagcg gcagtggatc tgggacggat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagacttta caacttacta ttgtcaacag gcttacagtc tccctctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

40 <210> 154
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 154

ES 2 804 592 T3

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

<210> 155

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 155

cagggtatta ccagctgg

18

<210> 156

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 156

Gln Gly Ile Thr Ser Trp

1

5

<210> 157

<211> 9

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 157

gctgcagcc

9

<210> 158

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 158

ES 2 804 592 T3

Ala Ala Ala
1

5 <210> 159
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 159
caacaggctt acagtctccc tctcact 27

15 <210> 160
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 160

Gln Gln Ala Tyr Ser Leu Pro Leu Thr
1 5

25 <210> 161
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

35 <400> 161

cagggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	gtgggtccagc	ctgggagggtc	cctgagactc	60
tctgtgagc	cctctggatt	caccttcagt	agctatggct	tgcactgggt	ccgccagtct	120
ccaggcaagg	ggctggaatg	ggtggcactt	atatcatatg	acggaagtaa	taaatactat	180
gcagactccg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaata	acagcctgag	acctgaggac	acggctggat	atttctgtgc	gaaatcccta	300
tatacaacca	gctggtacgg	gggctttgac	tattggggcc	agggaaccct	ggtcaccgtc	360
tctca						366

40 <210> 162
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 162

ES 2 804 592 T3

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

<210> 163
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 163
 ggattcacct tcagtagcta tggc 24

<210> 164
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 164

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Gly
1				5			

<210> 165
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 165
 atatcatatg acggaagtaa taaa 24

<210> 166
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 166

ES 2 804 592 T3

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

5 <210> 167
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 167
gcgaaatccc tatatacaac cagctggtac gggggcttgg actat 45

15 <210> 168
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 168

Ala Lys Ser Leu Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5 10 15

25 <210> 169
<211> 321
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

35 <400> 169

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtc ggggtattaga agctggtag cctgggtatca gcaaaaacca 120
gggaaagccc ctaacctcct gatctatgct gcgtccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctccac ttcgggcct 300
gggaccaaag tggatatcaa a 321

40 <210> 170
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 170

ES 2 804 592 T3

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

<210> 171
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 171
 cagggtatta gaagctgg 18

<210> 172
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 172

Gln	Gly	Ile	Arg	Ser	Trp
1				5	

<210> 173
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 173
 gctgcgtcc 9

<210> 174
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 174

ES 2 804 592 T3

Ala Ala Ser
1

5 <210> 175
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 175
caacaggcta acagttccc tccact 27

15 <210> 176
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 176

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr

1 5

25 <210> 177
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

35 <400> 177

gagggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	ttggtacagc	ctgggggggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctgggtt	caccttcagc	aactatgcca	tgacctgggt	ccgccaggct	120
ccagggaagg	ggctggagtg	ggtctcaact	atcagtggca	gtggtgataa	cacatactac	180
gcagactccg	tgcaaggccg	gttcaccatc	tccagaggcc	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaataa	acagcctgag	agccgaggac	acggccgtat	attactgtgc	gaaacctacg	300
tatagcagaa	gctggtacgg	tgcttttgat	ttctggggcc	aagggaacaat	ggtcaccgct	360
tcttca						366

40 <210> 178
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 178

ES 2 804 592 T3

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

<210> 179
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 179
 ggggtcacct tcagcaacta tgcc 24

<210> 180
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 180

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr	Ala
1				5			

<210> 181
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 181
 atcagtggca gtggtgataa caca 24

<210> 182
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 182

ES 2 804 592 T3

Ile Ser Gly Ser Gly Asp Asn Thr
1 5

5 <210> 183
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 183
gcgaaacctt cgtatagcag aagctggtac ggtgctttg atttc 45

15 <210> 184
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 184

25 Ala Lys Pro Thr Tyr Ser Arg Ser Trp Tyr Gly Ala Phe Asp Phe
1 5 10 15

<210> 185
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

35 <400> 185

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca ggggtattag agctgggttag cctgggtatca gcagaaaccg 120
gggaaagccc ctcaactcct gatctatgct gcatccagat tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttctggg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagatcttg caacttacta ttgtcaacag gctaacaatt tccattcac tttcggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa a 321

40 <210> 186
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 186

ES 2 804 592 T3

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

<210> 187
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 187
 cagggtatta gcagctgg 18

<210> 188
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 188

Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Trp
1				5	

<210> 189
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 189
 gctgcatcc 9

<210> 190
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 190

ES 2 804 592 T3

Ala Ala Ser
1

5 <210> 191
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 191
caacaggcta acaatttccc attcact 27

15 <210> 192
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 192

Gln Gln Ala Asn Asn Phe Pro Phe Thr
1 5

25 <210> 193
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

35 <400> 193

caggttcagc	tgggtgcagtc	tggagctgag	gtgaagaagc	ctgggggcctc	agtgaaggtc	60
tcctgcaagg	cttctgggta	cacctttacc	agttatggta	tcagctgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	gccttgagtg	gatgggatg	atccgcgctt	acaatgggta	cacaaactat	180
gcacagaagt	ttcagggcag	agtcaccatg	accacagaca	catccacgaa	caccgcctac	240
atggagctga	ggaccctgaa	ttctgacgat	acggccgttt	attactgtgc	gagagatcga	300
tatagtggga	gcttccacgg	taactttgac	tactggggcc	agggaaccct	ggtcaccgtc	360
tcctca						366

40 <210> 194
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 194

ES 2 804 592 T3

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

<210> 195
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 195
 gggtacacct ttaccagtta tgggt 24

<210> 196
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 196

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly
 1 5

<210> 197
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 197
 atccgcgctt acaatgggta caca 24

<210> 198
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 198

ES 2 804 592 T3

Ile Arg Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr
1 5

5 <210> 199
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 199
gcgagagatc gatatagtg gagctccac ggtaacttg actac 45

15 <210> 200
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 200

25 Ala Arg Asp Arg Tyr Ser Gly Ser Phe His Gly Asn Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 201
<211> 321
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

35 <400> 201

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcgt ctgtaggaga cagagtgacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggatatttc agctggtag cctggatatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaggtcct aatctatgct gcatccaatt tggaaagtgg ggtcccatca 180
agggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt taccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321
```

40 <210> 202
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 202

ES 2 804 592 T3

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

5 <210> 203
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 203
 cagggtattt tcagctgg 18

15 <210> 204
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético
 <400> 204

			Gln	Gly	Ile	Phe	Ser	Trp
			1				5	

25 <210> 205
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 205
 gctgcatcc 9

40 <210> 206
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 206

ES 2 804 592 T3

Ala Ala Ser
1

5 <210> 207
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 207
caacaggcta acagttacc gctcact 27

15 <210> 208
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 208

Gln Gln Ala Asn Ser Leu Pro Leu Thr
1 5

25 <210> 209
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

35 <400> 209

gagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttgggtccagc ctggggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acctattcta tgcactgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg gactggaata tgtttcaact attaataata atgggggatac cacatattat 180
gcagactctg tgaagggcag attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
cttcaactgg gcagcctgag acctgaggac atggctgtgt attactgtgc gagacagacg 300
tataccagca gctgggtacgg ggggttcgac tcctggggcc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
tcctca 366

40 <210> 210
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 210

ES 2 804 592 T3

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

5
 <210> 211
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Sintético

<400> 211
 ggattcacct tcagtaccta ttct 24

15
 <210> 212
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Sintético

<400> 212

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	Ser
1				5			

25
 <210> 213
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Sintético

35
 <400> 213
 attaataata atggggatac caca 24

40
 <210> 214
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

ES 2 804 592 T3

<400> 214

Ile Asn Asn Asn Gly Asp Thr Thr
1 5

5

<210> 215
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Sintético

<400> 215

15 gcgagacaga cgtataccag cagctggtac ggggggttcg actcc 45

<210> 216
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Sintético

25 <400> 216

Ala Arg Gln Thr Tyr Thr Ser Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Ser
1 5 10 15

30

<210> 217
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Sintético

<400> 217

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggcga cagagtcacc 60
atcacttgct gggcgagtca ggggtattacc agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccaatt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcaccag cctgcagcct 240

gaggattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtc tcccattcac tttcggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa a 321

40

<210> 218
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Sintético

<400> 218

50

ES 2 804 592 T3

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

<210> 219

<211> 18

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Sintético

<400> 219

cagggtatta ccagctgg

18

<210> 220

15 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Sintético

<400> 220

Gln Gly Ile Thr Ser Trp

1

5

25

<210> 221

<211> 9

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Sintético

<400> 221

35 gctgcatcc

9

<210> 222

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Sintético

<400> 222

45

ES 2 804 592 T3

Ala Ala Ser
1

5 <210> 223
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 223
caacaggcta acagtctccc attcact 27

15 <210> 224
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 224

Gln Gln Ala Asn Ser Leu Pro Phe Thr
1 5

25 <210> 225
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

35 <400> 225

gaggtgcagc	tgggtggagtc	tggggggaggc	ttggtacagc	ctggggggggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	cacccttagc	agctatgcca	tgagctgggt	ccgccaggct	120
ccaggggaagg	ggctggagtg	ggtctcagct	attagtggta	gtgggtggcag	cacatactac	180
gcagactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	ctcgtgtgat	240
ctgcaattga	acagcctgag	agccgaggac	acggccgtat	attactgtgc	gaagacgctg	300
tatactacca	gctgggtacgg	gggcttccag	cactgggggc	agggcaccct	ggtcactgtc	360
tcctca						366

40 <210> 226
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 226

ES 2 804 592 T3

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

<210> 227
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 227
 ggattcaccc ttagcagcta tgcc 24

<210> 228
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 228

Gly	Phe	Thr	Leu	Ser	Ser	Tyr	Ala
1				5			

<210> 229
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 229
 attagtggta gtggtggcag caca 24

<210> 230
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

ES 2 804 592 T3

<400> 230

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

5 <210> 231
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 231
gcgaagacgc tgtatactac cagctggtac gggggcttcc agcac 45

15 <210> 232
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 232

25 Ala Lys Thr Leu Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Gln His
1 5 10 15

<210> 233
<211> 321
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

35 <400> 233

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctataggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggaatcagc agttggtag cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagtcc ctaagctcct gatctatgct gcgtcctctt tgcaaagtgg gttcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagtag cctgcagccc 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag actcacagtt tcccgtggac ggtcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

40 <210> 234
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 234

ES 2 804 592 T3

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

<210> 235
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 235
 caggaatca gcagttgg 18

<210> 236
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 236

Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Trp
1				5	

<210> 237
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 237
 gctgcgtcc 9

<210> 238
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 238

ES 2 804 592 T3

Ala Ala Ser
1

5 <210> 239
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 239
caacagactc acagttccc gtgg 24

15 <210> 240
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 240

Gln Gln Thr His Ser Phe Pro Trp
1 5

25 <210> 241
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

<400> 241

35 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacccttagg agctatttca tgacctgggt ccgccagggt 120
ccagggaagg ggctggaggg ggtctcagct attagtggca ttagtggtgg cacatactac 180
acagactccg ttaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt 240
ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggccgtat atttctgtgc gagaacgggtg 300
tatagtagta gttactacgg gggcttccag cactggggcc agggcaccct ggtcaccgtc 360
tcctca 366

40 <210> 242
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

45 <400> 242

ES 2 804 592 T3

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

<210> 243
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 243
 ggattcacc ttaggagcta tttc 24

<210> 244
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 244

Gly	Phe	Thr	Leu	Arg	Ser	Tyr	Phe
1				5			

<210> 245
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 245
 attagtggca ttagtggtgg caca 24

<210> 246
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 246

ES 2 804 592 T3

Ile Ser Gly Ile Ser Gly Gly Thr
1 5

5 <210> 247
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 247
gcgagaacgg tgtatagtag tagttactac gggggcttc agcac 45

15 <210> 248
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 248

25 Ala Arg Thr Val Tyr Ser Ser Ser Tyr Tyr Gly Gly Phe Gln His
1 5 10 15

<210> 249
<211> 321
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

35 <400> 249

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgtat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcaacttgtc gggcgagtca ggggtattagc agttgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgtt gcatccagtt tacaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag actaacagtt tccctctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

40 <210> 250
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Sintético

<400> 250

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

ES 2 804 592 T3

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

5 <210> 251
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 251
 cagggtatta gcagttgg 18

15 <210> 252
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético
 <400> 252

25 Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 1 5

30 <210> 253
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

35 <400> 253
 gttgcatcc 9

40 <210> 254
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintético

<400> 254

ES 2 804 592 T3

Val Ala Ser

1

5 <210> 255
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 255
caacagacta acagttccc tctcact 27

15 <210> 256
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 256

Gln Gln Thr Asn Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

25 <210> 257
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

35 <400> 257

gaggtgcagc	tggtggagtc	tggggggaggc	ttggtacagc	ctgggggggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	cacccttagg	agttatgtca	tgtactgggt	ccgccagggt	120
ccagggaagg	ggctggaggg	ggtctcaggt	attagtggca	gtagtgggtg	cacatactac	180
acagactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgttt	240
ctgcaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acggccgtat	atttctgtgc	gagatcggtg	300
tatagtacca	cctggtacgg	gggcttccag	cactggggcc	agggcaccct	ggtcaccgtc	360
tcctca						366

40 <210> 258
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 258

ES 2 804 592 T3

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

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Val Tyr Ser Thr Thr Trp Tyr Gly Gly Phe Gln His Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 259
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 259
 ggattcaccc ttaggagtta tgtc 24

<210> 260
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 260

Gly Phe Thr Leu Arg Ser Tyr Val
 1 5

<210> 261
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 261
 attagtggca gtagtggtgg caca 24

<210> 262
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

ES 2 804 592 T3

<400> 262

Ile Ser Gly Ser Ser Gly Gly Thr
1 5

5

<210> 263
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Sintético

15

<400> 263
gcgagatcgg tgtatagtac cacctggtac gggggcttcc agcac 45

20

<210> 264
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

25

<400> 264

Ala Arg Ser Val Tyr Ser Thr Thr Trp Tyr Gly Gly Phe Gln His
1 5 10 15

30

<210> 265
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Sintético

<400> 265

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgtat ctgtgggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtc ggttattagc agttgggttag cctggtatca gctgaaacca 120
gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccagtt tacaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcgg cctgcagcct 240
gaagattttg cagtttacta ttgtcaacag actaacagtt tccctctcac ttccggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

40

<210> 266
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Sintético

50

<400> 266

ES 2 804 592 T3

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

65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 267
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 267
 caggttatta gcagttgg 18

15 <210> 268
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 268

Gln Val Ile Ser Ser Trp
 1 5

25 <210> 269
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 269
 gctgcatcc 9

40 <210> 270
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 270

ES 2 804 592 T3

Ala Ala Ser
1

5 <210> 271
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 271
caacagacta acagttccc tctcact 27

15 <210> 272
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 272

Gln Gln Thr Asn Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

25 <210> 273
<211> 366
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

35 <400> 273

gaggtgcagc	tgggtggagtc	tgggggaaac	ttggaacagc	ctgggggggtc	ccttagactc	60
tcctgtacag	cctctggatt	caccttttagc	agatctgcca	tgaactgggt	ccgccgggct	120
ccaggggaagg	ggctggagtg	ggtctcagga	attagtggta	gtgggtggtcg	aacatactac	180
gcagactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	tacgctatat	240
ctgcaaataga	acagcctgag	cgccgaggac	acggccgcat	attactgtgc	gaaagattcg	300
tatactacca	gttgggtacgg	aggtatggac	gtctgggggcc	acggggaccac	ggtcaccgtc	360
tcctca						366

40 <210> 274
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

45 <400> 274

ES 2 804 592 T3

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

5 <210> 275
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 275
ggattcacct ttagcagatc tgcc 24

15 <210> 276
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 276

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Ser Ala
1 5

25

<210> 277
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

35 <400> 277
attagtggta gtggtggtcg aaca 24

40 <210> 278
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

ES 2 804 592 T3

<400> 278

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr
1 5

5

<210> 279

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Sintético

<400> 279

15

gcgaagatt cgtatactac cagttggtac ggaggtatgg acgtc

45

<210> 280

<211> 15

<212> PRT

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

25

<400> 280

Ala Lys Asp Ser Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 281

30

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> Sintético

<400> 281

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtc gggatatttc agctggtag cctggtatca gcagaaacca 120
ggaaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcttccagtt tacaaagtgg ggtcccatca 180
agattcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaggattttg caatttacta ttgtcaacag gctaacagtg tcccgatcac cttcggccaa 300
gggacacgac tggagattaa a 321

40

<210> 282

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Sintético

<400> 282

50

ES 2 804 592 T3

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

<210> 283
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 283
 cagggtattt tcagctgg 18

<210> 284
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 284

Gln Gly Ile Phe Ser Trp
 1 5

<210> 285
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 285
 gctgcttcc 9

<210> 286
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 286

ES 2 804 592 T3

Ala Ala Ser
1

5 <210> 287
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 287
caacaggcta acagtgtccc gatcacc 27

15 <210> 288
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 288

Gln Gln Ala Asn Ser Val Pro Ile Thr
1 5

25 <210> 289
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

35 <400> 289

gaggtgcagc	tggtggagtc	tggggggaggc	ttggtacagc	ctgggggggtc	cctgagactc	60
tcctgttcag	cctctggatt	caccttttagc	agctatgcca	tgaactgggt	ccgccaggct	120
ccagggaagg	ggctggagtg	ggtcaccgct	attagtggca	gtggtggtgg	cacatactac	180
gcagactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	ctcgtctgtt	240
ctgcaattga	acagcctgag	agccgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gaaacaaacg	300
tataccagca	gctggtacgg	tggctttgat	atctggggcc	aggggacaat	ggtcaccgtc	360
tcttca						366

40 <210> 290
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 290

ES 2 804 592 T3

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

<210> 291
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 291
 ggattcacct ttagcagcta tgcc 24

<210> 292
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 292

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Ala
1				5			

<210> 293
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 293
 attagtggca gtggtggtgg caca 24

<210> 294
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 294

ES 2 804 592 T3

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr
1 5

5 <210> 295
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 295
gcgaacaaa cgtataccag cagctggtac ggtggctttg atatc 45

15 <210> 296
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 296

25 Ala Lys Gln Thr Tyr Thr Ser Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Ile
1 5 10 15

<210> 297
<211> 321
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

35 <400> 297

gacatccaga tgacccagtc gccatcttcc gtgtccgcgt ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggttttagt tcttggttag cctggtatca gcagatacca 120
gggaaagccc ccaagtcct gatctatgct gcatcaaggt tgcaaagtgg ggtcccatcc 180
aggttccgcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaggattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccgcctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

40 <210> 298
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 298

ES 2 804 592 T3

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

<210> 299

<211> 18

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Sintético

<400> 299

cagggtttta gttcctgg

18

<210> 300

15 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Sintético

<400> 300

Gln	Gly	Phe	Ser	Ser	Trp
1				5	

25

<210> 301

<211> 9

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Sintético

<400> 301

35 gctgcatca

9

<210> 302

<211> 3

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

45 <400> 302

ES 2 804 592 T3

Ala Ala Ser
1

5 <210> 303
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 303
caacaggcta acagtttccc gctcact 27

15 <210> 304
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 304

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

25 <210> 305
<211> 167
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

<400> 305

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

<210> 306
 <211> 167
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 306

```

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

          85           90           95
Cys Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn Arg
          100          105          110
Ser Phe Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly Val Phe
          115          120          125
Ile Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Tyr Ser
          130          135          140
Glu Asn Leu Gly Ser Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Ile Leu
145          150          155          160
Glu His His His His His His
          165
    
```

<210> 307
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 307

```

caggtcacct tgaaggagtc tggctcctgtg ctggtgaaac ccacagagag cctcacgctg 60
acctgctccg tctctggatt ctactcagc aatgtagtaa tgggtgtgag ctggatccgt 120
cagtccccag ggaaggccct ggagtggctt gcacacattt tttcgaatga cgaaaaatcc 180
tacaccacat ctctgaagac caggctcacc atctccaagg acacctccag aagccagggtg 240
gtccttacca tgaccgacat ggaccctggg gacacagcca catattactg tgcacggata 300
cggaatttgg cctttaatta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354
    
```

<210> 308
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

ES 2 804 592 T3

<400> 308

```

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

```

5

<210> 309
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Sintético

15

<400> 309
 ggattctcac tcagtaatgt tagaatgggt 30

20

<210> 310
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Sintético

30

<400> 310

```

Gly Phe Ser Leu Ser Asn Val Arg Met Gly
 1          5          10

```

35

<210> 311
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Sintético

45

<400> 311
 atttttcga atgacgaaaa a 21

50

<210> 312
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Sintético

<400> 312

Ile Phe Ser Asn Asp Glu Lys
1 5

5

<210> 313
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Sintético

<400> 313
gcacggatac ggaattggc cttaattac

30

<210> 314
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Sintético

<400> 314

Ala Arg Ile Arg Asn Leu Ala Phe Asn Tyr
1 5 10

<210> 315
<211> 339
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> Sintético

35

<400> 315

gacttcgtga	tgacccagtc	tccagactcc	ctggctgtgt	ctctgggcga	gagggccacc	60
atcaactgca	agtccagcca	gagtgtgtta	cacaggtcca	gcaataagaa	ctacttagct	120
tggtatcagc	agaagccagg	acagcctcct	aacctgctca	tttactgggc	atctacccgg	180
gaatccgggg	tccctgaccg	attcagtggc	agcgggtctg	ggacagattt	cactctcacc	240
atcagcagcc	tgcaaggctga	agatgtggca	gtttattact	gtcagcaata	ttatgggtact	300
ctattttactt	tcggccctgg	gaccaaagtg	gatatcaaa			339

40

<210> 316
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Sintético

<400> 316

50

ES 2 804 592 T3

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

<210> 317

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 317

cagagtgtgt tacacaggtc cagcaataag aactac

36

<210> 318

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 318

Gln	Ser	Val	Leu	His	Arg	Ser	Ser	Asn	Lys	Asn	Tyr
1				5					10		

<210> 319

<211> 9

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 319

tgggcatct

9

<210> 320

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 320

ES 2 804 592 T3

Trp Ala Ser
1

5 <210> 321
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 321
cagcaatatt atgtactct atttact 27

15 <210> 322
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 322

Gln Gln Tyr Tyr Gly Thr Leu Phe Thr
1 5

25
30 <210> 323
<211> 338
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Aminoácidos sintéticos 1-310: ST2 humano (K19-S328 con número de acceso NP_057316.3) Aminoácidos 311-338: marcador Myc-Myc-hexahistidina

35 <400> 323

ES 2 804 592 T3

[illegible]

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humano o fragmento de unión al antígeno del mismo para usar en un método de tratamiento del asma crónica en un paciente que lo necesita, en donde el método comprende administrar, al paciente, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a la interleucina 33 humana (IL-33) y comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 274 y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 282.
2. Un anticuerpo monoclonal humano o fragmento de unión al antígeno del mismo para usar en un método de tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en un paciente que lo necesita, en donde el método comprende administrar, al paciente, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a la interleucina 33 humana (IL-33) y comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 274 y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 282.
3. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno para usar de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la EPOC se debe a o está causada en parte por, el humo del tabaco directo o indirecto.
4. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el método comprende además administrar una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico útil para aliviar el asma crónica o EPOC, opcionalmente, en donde el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un corticoesteroide, un dilatador bronquial, un antihistamínico, epinefrina, un descongestionante, un antagonista de la linfopoyetina del estroma tímico (TSLP, *Thymic Stromal Lymphopoietin*), un antagonista de IL-13, un antagonista de IL-4, un antagonista dual de IL-4/IL-13, un antagonista de IL-5, un antagonista de IL-6, antagonista de IL-12/23, un antagonista de IL-22, un antagonista de IL-25, un antagonista de IL-17, un antagonista de IL-31, un inhibidor oral de PDE4 y otro antagonista de IL-33 o un anticuerpo diferente contra IL-33.
5. El anticuerpo monoclonal humano para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un anticuerpo IgG1.
6. El anticuerpo monoclonal humano para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un anticuerpo IgG4.

Unión de mAb-1 al complejo previo de mAb-2 e IL-33 humana																								
mAb-1	mAb capturado	n.º de mAb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
H4H9628P	1,86 ± 0,11	1	-0,00	0,03	0,02	0,01	0,01	0,01	0,03	0,02	0,04	0,22	0,00	0,02	0,09	0,05	0,03	0,10	-0,10	1,45	1,00	0,00	0,22	0,14
H4H9623P	1,75 ± 0,04	2	0,02	0,00	-0,01	-0,01	0,00	-0,01	0,01	0,00	0,02	-0,01	-0,01	0,00	0,07	0,02	0,03	0,07	-0,10	1,32	0,69	0,00	0,21	0,15
H4H9640P	1,64 ± 0,03	3	-0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	-0,02	0,01	0,03	0,01	-0,01	-0,01	0,10	0,05	0,02	0,09	-0,11	1,20	0,70	0,00	0,16	0,10
H4H9668P	1,4 ± 0,00	4	0,02	0,03	0,01	0,00	0,01	0,01	0,03	0,00	0,03	0,00	0,01	0,00	0,10	0,04	0,03	0,05	-0,05	1,00	0,59	0,00	0,17	0,03
H4H9660P	1,53 ± 0,13	5	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01	0,00	0,09	0,06	0,03	0,11	-0,03	1,06	0,71	0,00	0,21	0,15
H4H9662P	1,51 ± 0,05	6	0,03	0,00	0,01	0,00	0,03	0,03	0,02	0,01	0,03	0,01	0,01	0,00	0,04	0,07	0,04	0,03	-0,10	1,12	0,89	0,00	0,19	0,13
H4H9653P	1,51 ± 0,04	7	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,01	-0,01	0,01	0,06	0,03	0,03	0,02	-0,10	1,09	0,85	0,00	0,17	0,09
H4H9664P	1,51 ± 0,04	8	-0,02	-0,01	-0,02	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,02	0,03	0,01	0,01	0,06	0,03	0,03	0,08	-0,09	0,97	0,38	0,00	0,16	0,10
H4H9665P	1,53 ± 0,03	9	0,02	0,01	-0,01	-0,01	0,02	0,02	-0,01	-0,01	0,00	0,00	-0,01	0,00	0,07	0,02	0,01	0,06	-0,09	1,28	0,80	0,00	0,14	0,03
H4H9666P	1,53 ± 0,03	10	0,04	0,02	0,02	0,03	0,01	0,02	0,03	0,02	0,04	0,00	0,00	0,02	0,06	0,02	0,00	0,05	-0,05	1,17	0,59	0,00	0,15	0,08
H4H9667P	1,47 ± 0,1	11	-0,03	0,01	0,02	-0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,02	0,04	0,01	0,00	0,01	0,05	0,03	0,05	-0,10	1,09	0,87	0,00	0,23	0,12
H4H9670P	1,48 ± 0,06	12	-0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	-0,01	0,01	0,00	0,02	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,04	-0,09	1,13	0,54	0,00	0,15	0,12
H4H9671P	1,92 ± 0,04	13	-0,03	0,00	0,00	0,01	0,00	-0,01	0,01	0,00	0,02	0,02	-0,01	0,00	0,00	-0,01	0,01	0,02	-0,08	1,17	0,96	0,00	0,13	0,07
H4H9672P	1,57 ± 0,08	14	0,03	-0,02	-0,01	-0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	-0,01	0,03	0,01	0,00	0,01	0,05	-0,08	1,11	0,88	0,00	0,15	0,07
H4H9675P	1,58 ± 0,14	15	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	0,02	0,05	0,03	0,03	0,04	0,01	0,02	0,02	0,00	0,00	0,01	0,07	1,11	0,88	0,00	0,13	0,11
H4H9678P	1,75 ± 0,07	16	-0,03	-0,01	-0,03	0,03	0,05	-0,05	-0,05	-0,05	-0,07	0,05	0,01	-0,02	0,05	-0,04	-0,03	0,08	0,08	1,07	0,74	0,00	0,11	0,10
H1H9659M	0,93 ± 0,14	17	-0,16	-0,10	-0,06	-0,08	-0,15	0,11	0,18	-0,12	0,16	0,15	0,05	0,09	0,15	-0,16	-0,10	0,13	0,00	0,86	0,48	0,00	0,08	0,11
H1H9656M	0,76 ± 0,02	18	0,40	0,46	0,47	0,52	0,41	0,46	0,58	0,47	0,57	0,52	0,47	0,46	0,42	0,49	0,47	0,37	0,38	0,80	0,40	0,00	0,06	0,10
H1H9656M	0,66 ± 0,02	19	0,44	0,57	0,53	0,55	0,45	0,58	0,59	0,51	0,53	0,56	0,58	0,56	0,48	0,53	0,50	0,54	0,52	0,87	0,50	0,00	0,04	0,10
Control de isotipo 1			0,12	0,00	0,01	0,03	0,03	0,02	0,02	-0,02	-0,03	0,02	0,01	0,01	0,00	-0,02	0,00	0,01	0,00	0,09	0,06	0,00	0,00	0,07
Control de isotipo 2			-0,14	-0,15	0,06	-0,08	-0,12	-0,10	-0,12	-0,12	-0,17	-0,14	-0,12	-0,12	-0,15	-0,14	-0,14	-0,14	-0,12	-0,13	0,09	0,04	0,00	0,08

Figura 1

Unión de mAb-2 al complejo previo de mAb-1 y MIL-33-6xHis																										
mAb-1	MIL-33-dactis capturado (nm)	Unión de mAb-1 (nm)	n.º de mAb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
H4H9629P	0,15 ± 0,01	0,72 ± 0,02	1	0,03	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,07	0,02	0,01	0,03	0,05	0,04	0,03	0,06	0,04	0,01	0,21	0,60	0,58	0,01	0,01
H4H9633P	0,16 ± 0,01	0,84 ± 0,01	2	0,07	0,02	0,02	0,03	0,03	0,04	0,05	0,03	0,05	0,04	0,01	0,04	0,06	0,05	0,06	0,09	0,02	0,32	0,59	0,47	0,01	0,00	
H4H9640P	0,16 ± 0,01	0,81 ± 0,01	3	0,02	0,01	0,03	0,02	0,02	0,03	0,04	0,03	0,04	0,03	0,02	0,02	0,04	0,03	0,03	0,04	0,03	0,24	0,60	0,50	0,02	0,01	
H4H9650P	0,15 ± 0,01	0,86 ± 0,02	4	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	0,05	0,02	0,01	0,03	0,05	0,03	0,03	0,04	0,02	0,24	0,52	0,48	0,01	0,01	
H4H9660P	0,15 ± 0,01	0,88 ± 0,02	5	0,03	0,01	0,02	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02	0,06	0,02	0,01	0,03	0,05	0,03	0,03	0,04	0,03	0,24	0,52	0,48	0,02	0,00	
H4H9670P	0,15 ± 0,01	0,86 ± 0,02	6	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,01	0,02	0,00	0,27	0,51	0,48	0,02	0,01	
H4H9683P	0,15 ± 0,01	0,84 ± 0,02	7	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,05	0,01	0,01	0,02	0,03	0,02	0,03	0,02	0,01	0,26	0,48	0,48	0,02	0,00	
H4H9694P	0,15 ± 0,01	0,81 ± 0,02	8	0,03	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,03	0,02	0,03	0,04	0,02	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03	0,02	0,26	0,58	0,47	0,04	0,01	
H4H9685P	0,16 ± 0,01	0,83 ± 0,02	9	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,28	0,58	0,42	0,03	0,01	
H4H9666P	0,16 ± 0,01	0,87 ± 0,03	10	0,00	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,05	0,03	0,03	0,02	0,05	0,03	0,03	0,05	0,01	0,22	0,57	0,39	0,00	0,00	
H4H9667P	0,16 ± 0,01	0,89 ± 0,02	11	0,04	0,02	0,03	0,03	0,03	0,04	0,02	0,03	0,05	0,03	0,02	0,03	0,05	0,03	0,04	0,04	0,03	0,27	0,55	0,50	0,03	0,00	
H4H9670P	0,16 ± 0,01	0,86 ± 0,02	12	0,02	0,03	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02	0,05	0,01	0,02	0,03	0,04	0,03	0,03	0,05	0,02	0,23	0,51	0,48	0,01	0,01	
H4H9671P	0,15 ± 0,01	0,88 ± 0,03	13	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,03	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	0,01	0,23	0,51	0,44	0,02	0,02	
H4H9672P	0,15 ± 0,01	0,86 ± 0,03	14	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,04	0,00	0,01	0,02	0,03	0,01	0,02	0,02	0,03	0,22	0,49	0,41	0,04	0,01	
H4H9673P	0,15 ± 0,01	0,82 ± 0,02	15	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,04	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,00	0,24	0,40	0,38	0,03	0,00	
H4H9675P	0,16 ± 0,01	0,82 ± 0,02	16	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,02	0,01	0,22	0,53	0,46	0,02	0,02	
H4H96588N	0,16 ± 0,01	0,80 ± 0,02	17	0,03	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,03	0,05	0,02	0,02	0,02	0,04	0,02	0,03	0,03	0,03	0,21	0,52	0,48	0,01	0,00	
H4H96668N	0,16 ± 0,01	0,86 ± 0,02	18	0,24	0,22	0,24	0,22	0,22	0,21	0,23	0,21	0,23	0,23	0,21	0,22	0,26	0,24	0,26	0,26	0,19	0,08	0,30	0,23	0,04	0,02	
H4H96888N	0,15 ± 0,01	0,83 ± 0,02	19	0,45	0,46	0,44	0,43	0,42	0,41	0,47	0,44	0,46	0,47	0,43	0,43	0,46	0,46	0,44	0,45	0,38	0,29	0,00	0,44	0,04	0,02	
H4H96608N	0,16 ± 0,01	0,81 ± 0,02	20	0,38	0,33	0,30	0,29	0,28	0,27	0,34	0,26	0,35	0,30	0,28	0,29	0,42	0,38	0,39	0,43	0,38	0,17	0,48	0,35	0,00	0,01	
Control de isótopo	0,16 ± 0,01	0,01 ± 0,01	21	0,25	0,26	0,26	0,25	0,26	0,22	0,21	0,27	0,10	0,28	0,26	0,21	0,26	0,25	0,26	0,25	0,21	0,24	0,35	0,24	0,04	0,03	
Tampon	0,16 ± 0	0,01 ± 0	22	0,30	0,32	0,33	0,31	0,31	0,26	0,31	0,31	0,33	0,32	0,30	0,30	0,30	0,31	0,29	0,25	0,25	0,34	0,38	0,27	0,03	0,03	

Figura 2